Massenspektrometrische Identifizierung posttranslationaler Modifizierungen mit monomeren N-Acetylglukosamin an Proteasomen

vorgelegt von

Diplom Ingenieur der Biotechnologie

Thorsten Overath

geboren am 02.11.1979 in Strausberg

eingereicht an der Fakultät III – Prozesswissenschaften der Technischen Universität Berlin zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurswissenschaften

genehmigte Dissertation

Gutachter: 1: Prof. R. Lauster

2: Prof. P. M. Kloetzel

3: Prof. L. Garbe

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 01. Dezember 2010 Berlin 2011

D83

Inhaltverzeichnis

Zu	samme	nfassung	III
Ab	stract		IV
Ab	kürzur	igen	V
1.	Einle	itung	1
1.	1 Prote	ein-Modifizierungen mit monomerem N-Acetylglukosamin	2
	1.1.1 1.1.2 1.1.3	Die O-GlcNAc Enzyme Biologische Bedeutung von O-GlcNAc Strategien zum Nachweis von O-GlcNAc-Modifizierungen an Proteinen	3 4 7
1.	2 Das	Ubiquitin-Proteasom-System	17
	1.2.1 1.2.2 1.2.3	Konstitutive und Immuno-20S-Proteasomen Das 26S-Proteasom Posttranslationale Modifizierungen an Proteasomen	18 20 20
1.	3 Ziels	tellung	22
2.	Mate	rial und Methoden	23
2.	1 Mate	rial	23
2.	2 Meth	oden	26
	2.2.1 2.2.1 2.2.2 2.2.3 2.2.4 2.2.5 2.2.5 2.2.5 2.2.5 2.2.5 2.2.5 2.2.6 2.2.6 2.2.6 2.2.6 2.2.6 2.2.6 2.2.6 2.2.6	 Präparation von 20S-Proteasomen und HSP90 .1 Herstellung von Organ-Homogenaten .2 Präparation von 20S Proteasomen und HSP90 aus Organ-Homogenaten Denaturierende eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese Westernblot-Analyse und Immundetektion Synthese des Biotin-Cystamin-d0/d4-Derivatisierungsreagenz Methoden für das Arbeiten mit Modellpeptiden .1 β-Eliminierung/Michael Addition von glykosylierten Modell-Peptiden .2 Streptavin-Affinitätschromatographie .3 <i>ZipTip/µZipTip</i>-C18 Entsalzung .4 MALDI TOF/TOF MS und MSMS Methoden für das Arbeiten mit Proteinen .1 Methanol/Chloroform-Präzipitation .2 In-Atmosphäre Oxidation .3 Tryptischer In-Lösung-Verdau .4 Dephosphorylierung und Deglykosylierung .5 β-Eliminierung/Michael Addition mit Bio-Cys-d0/d4 	26 26 27 28 28 30 31 31 31 33 33 34 34 34 34 35 35 36 26
	2.2.6 2.2.6 2.2.6	5.6 Größenausschluss-Chromatographie über <i>Superdex Peptide</i> PC3.2/30 5.7 Streptavidin-Affinitätschromatographie tryptischer Bio-Cys-d0/d4-Derivate 5.8 Nano-HPLC-MALDI-TOF/TOF MS und MSMS	36 36 37

3.	Ergeł	onisse und Diskussion	40
3	.1 Char über	akterisierung von O-GlcNAc-Modifizierungen an 20S-Proteasomen Westernblot-Experimente	40
	3.1.1	Detektion von O-GlcNAc-Modifizierungen an murinen Leber-, Milz-, Gehirn-20S- Proteasomen und Leber-HSP90	41
	3.1.2	Deglykosylierung von 20S-Proteasomen	44
3	.2 Entw mass	icklung und Erprobung eines neuen Derivatisierungsreagenz zum enspektrometrischen Nachweis monomerer O-GlcNAc-Modifizierungen	48
	3.2.1	Aufbau und Anforderungen an das neue Derivatisierungsreagenz Biotin-Cystamin	48
	3.2.2	Untersuchung der Derivatisierungseffizienz von Biotin-Cystamin	50
	3.2.3 3.2.4	Tandemmassenspektrometrie Biotin-Cystamin-derivatisierter Peptide Entfernung von überschüssigem Biotin-Cystamin über Größenausschluss- Chromatographie	53 54
	325	Effektivität der Streptavidin-Anreicherung biotinylierter Peptide	56
	3.2.6	Relative Quantifizierung zwischen Biotin-Cystamin-d0 und -d4-markierten Glyko- Peptiden	58
	3.2.7	Anwendung der neuen Derivatisierungsstrategie zum Nachweis der O-GlcNAc Modifizierung an Ser 162 des Modellproteins α-Crystallin	60
	3.2.8	Evaluierung des Isotopen-Effektes Bio-Cys-d0/d4-markierter Peptide während der C18-Umkehrphasen-Chromatographie	63
	3.2.9	β -Eliminierung/Michael Addition-bedingte Bildung von Diastereoisomeren	65
3	.3 Mass	enspektrometrische Lokalisierung neuer O-GlcNAc-Positionen an HSP90	
	und 2	20S-Proteasomen	69
	3.3.1	Murines Leber-HSP90	69
	3.3.2	Murine 20S-Proteasomen aus Milz und Gehirn	79
4.	Litera	tur	89
An	hang		100
Ve	Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge 11		
Da	Danksagung 11		
Erl	Erklärung 11		

Zusammenfassung

Das Proteasom ist ein abundanter proteolytischer Komplex. Es degradiert ATP-abhängig polyubiquitinierte Substrat-Proteine und nimmt eine wichtige Rolle im Zellzyklus und der Zellvermittelten Immunität ein. Der Komplex, welcher die selektive Proteolyse ermöglicht, ist das 26S-Proteasom. Es setzt sich aus dem proteolytisch aktiven 20S-Kern und ein oder zwei 19S-Regulatoren zusammen.

In Westernblot-Experimenten konnte gezeigt werden, dass 20S- und 26S-Proteasomen von der Fruchtfliege bis zum Menschen mit monomerem N-Acetylglukosamin (O-GlcNAc), eine Serin/Threonin-Modifizierung ähnlich der Phosphorylierung, markiert werden können. Es existieren Beispiele für antagonistische und synergistische Kreuz-Kommunikationen zwischen diesen beiden Modifizierungen. Im Gegensatz zu poly N- und O-Glykosylierungen handelt es sich bei O-GlcNAc um eine substöchiometrische, reversible und dynamische Modifizierung zytosolischer und nukleärer Proteine. Ihr werden wichtige Rollen in Signaltransduktionswegen und der Entwicklung von chronischen Krankheiten wie Diabetes mellitus, Alzheimer und Krebs zugeschrieben. Die exakten Positionen und der Einfluss dieser Zucker-Modifizierung auf Proteasomen sind größtenteils unbekannt.

In dieser Arbeit wird eine β-Eliminierung/Michael Addition-basierte quantitative Derivatisierungsstrategie mit einem neuen nukleophilen Reagenz, bestehend aus einem Biotin- und einem Cystamin-Rest, vorgestellt. Durch die eingeführte Markierung ist es nicht nur möglich substöchiometrisch O-GlcNAc-modifizierte Proteine/Peptide effektiv affinitätschromatographisch anzureichern, die eingeführte Markierung ist darüber hinaus, im Gegensatz zu O-GlcNAc selbst, unter massenspektrometrischen stoßaktivierten Zerfallsbedingungen stabil, was eine exakte Identifizierung der O-GlcNAc-Modifizierungsposition ermöglicht. Während der Fragmentierung erzeugt die Markierung Indikator-Ionen, welche ein automatisches Durchsuchen von großen MS-Datensätzen nach potentiell O-GlcNAc-modifizierten Kandidaten erlaubt. Aufgrund bekannter β-Eliminierung/Michael Addition-assoziierter Nebenreaktionen, wie dem unspezifischen Umsatz unmodifizierter Serin/Threonin-Reste, wurde ein strukturell identischer aber vier Dalton schwererer, stabil deuterierter Biotin-Cystamin-Rest synthetisiert. Dieser erlaubt eine relative Quantifizierung zwischen deglykosylierter und glykosylierter Probe innerhalb eines MS-Spektrums. Mit dieser Methode war es möglich, eine bekannte und sieben vorher unbekannte O-GlcNAc-Modifizierungen an murinen Milz- und Gehirn-20S-Proteasomen sowie zwei unbekannte an murinem Leber-HSP90 zu identifizieren. Die O-GlcNAc-Position an Ser452 von HSP90ß ist eine bekannte Phosphorylierungsstelle, was auf einen antagonistischen Zusammenhang zwischen diesen beiden Modifizierungen hinweist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deutlich, dass aufgrund der hohen Gewebe-abhängigen Diversität der 20S-Proteasom-Komplexe, ungewöhnlich große Mengen an aufgereinigten Protein für den O-GlcNAc-Nachweis eingesetzt werden mussten. Die hier präsentierten Ergebnisse eröffnen neue Perspektiven für nachfolgende Untersuchungen über den Einfluss dieser abundanten, regulatorischen posttranslationalen Modifizierung.

Abstract

The proteasome is an abundant proteolytic complex. It degrades poly-ubiquitinated substrates in an ATP-dependent manner and plays a crucial role in cell cycle and cell derived immunity. The complex which is responsible for this selective proteolysis is called 26S-proteasome. It consists of a 20S catalytical core complex and one or two 19S regulatory complexes.

Westernblot-experiments showed that 20S- and 26S-proteasomes from fruit fly to man are extensively modified by monomeric β -O linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc), which similar to phosphate can be found on serine/threonine-residues. There are examples of extensive antagonistic and synergistic cross talk between these two modifications. In contrast to poly N- and O-glycosylations O-GlcNAc is a substochiometric, reversible and dynamic cytosolic and nuclear modification. It has been shown that O-GlcNAc takes part in cell signaling events and in development of chronic diseases such as Diabetes mellitus, Alzheimer's disease and cancer. The exact sites and the impact of this sugar modification on proteasomes are largely unknown.

Here we describe a β-elimination/michael addition based quantitative derivatisation strategy with a new nucleophilic tag consisting of a biotin- and a cystamine-moiety. This tag not only allows an efficient affinity purification of substochiometric O-GlcNAc-modified proteins/peptides but, in contrast to O-GlcNAc itself, it is also stable under mass spectrometry collision induced fragmentation conditions allowing the exact identification of the modified serine/threonine residue. During fragmentation the tag produces abundant indicator ions, facilitating the screening of huge MS data sets for potentially O-GlcNAc-modified candidates. Due to the known β-elimination/michael addition-associated side reactions, like unspecific derivatisation of unglycosylated serine/threonineresidues, we synthesized a structural identical but four dalton heavier stable deuterated biotincystamine-tag which allows relative quantification between a deglycosylated and glycosylated sample in one MS-spectrum. With this application we were able to identify one known and seven formally unknown O-GlcNAc-sites on 20S-proteasomes isolated from mouse spleen and brain and two unknown O-GlcNAc-sites on HSP90 from mouse liver. The O-GlcNAc-site on Ser452 of HSP90^β is also a known phosphorylation-site indicating an antagonistic relationship between these two modifications. In the course of this work we noticed that due to the vast tissue-dependent diversity of the 20S-proteasome complexes, it was necessary to use unusual huge amounts of isolated protein for the O-GlcNAc-detection. These findings open new perspectives for further investigations concerning the impact of this abundant and crucial regulatory posttranslational modification.

Abkürzungen

(α/β) -O-GalNAc	(α/β) -O-gebundenes N-Acetylgalaktosamin
(α/β) -O-GalNAz	(α/β) -O-gebundenes N-Azidogalaktosamin
(α/β) -O-GlcNAc	(α/β) -O-gebundenes N-Acetylglukosamin
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
BEMAD	β-Eliminierung/Michael-Addition mit Dithiothreitol
Bio-Cys-d0	Biotin-Cystamin-d0
Bio-Cys-d4	Biotin-Cystamin-d4 mit deuteriertem Cystamin
CHCA	α -Cvano-4-hydroxyzimtsäure
CID	Kollision induzierte Dissoziation/stoßaktivierter Zerfall, engl. collision
	induced dissociation
DTT	Dithiothreitol
ECD	Elektroneneinfang-Dissoziation, engl. electron capture dissociation
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray-Ionisierung, engl. <i>electro spray ionisation</i>
ETD	Elektronentransfer-Dissoziation, engl. <i>electron transfer dissociation</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, engl. high performance liquid
	chromatography
INF-γ	Interferon-y
(M, k)Da	(Mega, Kilo) Dalton
MHC-Klasse-I	major histocompatibility complex-class-I
MALDI	Matrix unterstützte Laser Desorption/Ionisierung, engl. matrix assisted
	laser desorption/ionisation
Mr	Molekulargewicht
MS	Massenspektrometrie
MSMS	Tandemmassenspektrometrie
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis, engl. mass/charge ratio
OGA/Hex	β-N-Acetylglukosaminidase
OGT	O-GlcNAc-Transferase/Polypeptid β-N-Acetylglukosamyltransferase
ncOGT	nukleär cytoplasmatische OGT, engl. nuclear cytoplasmic OGT
mOGT	mitochondriale OGT, engl. mitochondrial OGT
sOGT	kurze OGT, engl. short OGT
PA28	Proteasom Aktivator 28
PMF	Peptidmassen-Fingerabdruck, engl. peptide mass fingerprint
РТМ	posttranslationale Modifizierung
PUGNAc	O-(2-Acetamido-2-desoxy-D-glucopyranosyliden)-amino-N-phenylcarbamat
SAP	alkalische Schrimpsphosphatase
SDS-PAGE	denaturierende Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
S/N	Signal/Rausch-Verhältnis, engl. singnal/noise ratio
SNP	einzel-Nukleotid-Polymorphismus, engl. single nucleotide polymorphism
TOF	Flugzeit, engl. time of flight
TPR	Tetratricopeptid-Wiederholungen, engl. tetratricopeptide repeats
UE	Untereinheit
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System

1. Einleitung

Das menschliche Genom umfasst etwa 30.000 Gene. Durch alternative Schnittvarianten der kodierenden mRNS entstehen daraus über 200.000 Proteine (Maniatis und Tasic 2002). Durch kovalente posttranslationale Modifizierungen (PTMs) an einer oder mehreren Stellen des Aminosäure-Gerüstes von Proteinen kann diese enorme Diversität noch gesteigert werden (Abb. 1-1).

PTMs können in zwei Bereiche unterteilt werden. Die erste Kategorie umfasst die proteolytische Prozessierung durch Proteasen oder seltener durch autokatalytische Spaltungsprozesse. Die zweite große Kategorie umfasst alle Enzym-katalysierten kovalenten Additionen von chemischen Gruppen an ein Protein. 15 der 20 proteinogenen Aminosäuren (AS) können posttranslational modifiziert werden (Walsh *et al.* 2005). Phosphorylierungen, Ubiquitinierungen, Acetylierungen, Oxidationen, Methylierungen und Glykosylierungen stellen hierbei die am häufigsten beobachteten Modifizierungen dar.



Abbildung 1-1: Diversität durch posttranslationale Modifizierungen. Aus einem einzelnen Gen können viele Genprodukte entstehen. Die Abbildung zeigt die zunehmende Komplexität von Genprodukten ausgehend von der genomischen DNS, über unterschiedlich lange mRNS-Produkte, und daraus translatierten Proteinen bis zu posttranslational modifizierten Proteinen [Abb. Nach (Vosseller *et al.* 2001)].

1.1 Protein-Modifizierungen mit monomerem N-Acetylglukosamin

Poly-N- und O-Glykosylierungen

N-glykosidische Modifizierungen am Amid-Stickstoff von Asn-Resten sind im Allgemeinen komplexer in ihrer Struktur und häufiger zu finden als poly-O-glykosidische Modifizierungen an Hydroxyl-Gruppen von Ser/Thr-Resten (Mechref und Novotny 2002). Die Anlagerung von poly-N-gebundenen Zuckern erfolgt im endoplasmatischen Retikulum (ER), während die Bindung poly-O-gebundener Glykane im Golgi Apparat erfolgt. Während N-Glykosylierungen gewöhnlich an Asn-X-Ser/Thr (X kann jede AS sein, außer Prolin) Sequenzmotiven zu lokalisieren sind, existiert bislang keine solche Konsensus-Sequenz für poly-O-Glykosylierungen. Die angelagerten Kohlenhydrat-Reste variieren stark hinsichtlich ihrer Komplexität und reichen von mono-, di-, oligo- bis hin zu poly-Sacchariden. Man findet sie in luminalen Bereichen der Zelle, wie der Kernhülle, dem ER und dem Golgi Apparat. Dort üben sie wichtige Funktionen bei der Protein-Faltung und -Sortierung aus, bieten sekretierten Proteinen Schutz vor zu schnellem Abbau und ermöglichen Zell-Zell-Interaktionen an der äußeren Zellmembran.

Monomere O-Glykosylierungen

Vor etwa 25 Jahren wurde erstmals die PTM mit monomeren β-O-gebundenem N-Acetylglukosamin (O-GlcNAc) beschrieben (Torres und Hart 1984). Bis zu diesem Zeitpunkt ging man davon aus, dass ausschließlich Membran-gebundene Proteine glykosyliert vorliegen können. Im Gegensatz zu N- und poly-O-Glykosylierungen handelt es sich bei O-GlcNAc um eine reversible, dynamische und substöchiometrische Modifizierung an Ser- und Thr-Resten zytoplasmatisch, nukleär und luminal lokalisierter Proteine (Torres und Hart 1984). Bislang ist keine Konsensus-Sequenz für monomere O-GlcNAc-Modifizierungen bekannt. Bevorzugt werden aber Sequenz-Motive, in denen der modifizierte Ser/Thr-Rest im Abstand von zwei bis drei AS N-terminal von einem Pro-Rest flankiert wird, oder innerhalb eines Abstandes von fünf AS ein Serin oder Threonin lokalisiert ist (Chalkley *et al.* 2009). Die Erkenntnis, dass die O-GlcNAc-Transferase häufig über die Bindung an Interaktionspartner zu Substrat-Proteinen geschleust wird, könnte eine mögliche Erklärung für das Fehlen einer strikten Konsensus-Sequenz sein.

O-GlcNAc-modifizierte Proteine sind üblicherweise auch über Phosphat-Reste modifiziert. Beide Modifizierungen können häufig in direkter Nachbarschaft zueinander beobachtet werden und kompetieren in einigen Fällen um dieselbe AS-Position (Comer und Hart 2000; Zachara und Hart

2002; Iyer und Hart 2003). Für einige Proteine konnte beobachtet werden, dass eine Phosphorylierungszunahme zu einer Glykosylierungsabnahme führt und umgekehrt. So wurde ein Ying und Yang Prinzip postuliert (Hart *et al.* 1995), welches besagt, dass O-GlcNAc einen Antagonisten zu Phosphorylierungen darstellt. In einigen Fällen trifft diese Hypothese zu. Sie kann aber keinesfalls verallgemeinert werden, da viele Beispiele existieren in denen ein Protein gleichzeitig glykosyliert und phosphoryliert vorliegen kann (Whelan und Hart 2003).

1.1.1 Die O-GlcNAc Enzyme

Die Enzyme, welche die Anlagerung bzw. Abspaltung von GlcNAc-Resten katalysieren, sind die O-GlcNAc-Transferase (OGT) und die O-GlcNAcase (OGA). Sie sind ubiquitär in Eukaryonten, Mycel-bildenden Pilzen und in einigen Prokaryonten vertreten. In Sprosshefen konnten bislang weder O-GlcNAc, noch Isoformen von OGT oder OGA identifiziert werden.

O-GlcNAc-Transferase

Die O-GlcNAc-Transferase nimmt bei der Regulation vieler zellulärer Funktionen, wie Transkription, Translation, Protein-Lokalisierung, in Signalwegen und der zytoskelettalen Architektur eine bedeutende Rolle ein (Hart *et al.* 2007). Ihre Struktur ist innerhalb der Eukaryonten hochkonserviert, und sie wird in Säugetieren durch ein einzelnes Gen kodiert (Lubas *et al.* 1997). OGT bildet heterotrimere Komplexe aus einer 110 kDa- und einer 78 kDa-Isoform. Die 110 kDa-UE teilt sich in zwei Hälften auf. Der N-terminale Bereich enthält mehrere Tetratricopeptid-Wiederholungen (TPR, engl. *tetratricopeptide repeats*), deren Funktion es ist, mit Substraten Protein-Protein-Interaktionen einzugehen. Die katalytische Glykosyltransferase-Aktivität ist am C-Terminus lokalisiert. In Säugetieren existieren drei Isoformen der OGT, welche sich in der Anzahl ihrer TPRs und damit in ihren Substrat-Spezifitäten und Lokalisierungen innerhalb der Zelle unterscheiden (Lazarus *et al.* 2006). Die größte Isoform ist die nukleär/zytoplasmatische OGT (ncOGT, engl. *nuclear/cytoplasmic*). Sie wird direkt mit Proteasom-Inhibition (Zhang, F. *et al.* 2003), Transkriptionsrepression (Yang, X. *et al.* 2002) und Stress-Toleranz in Zusammenhang

gebracht (Sohn *et al.* 2004; Zachara und Hart 2004; Zachara *et al.* 2004). Der N-Terminus der mitochondrialen OGT (mOGT, engl. *mitochondrial*) enthält eine mitochondriale Lokalisierungssequenz, welcher eine Membran-durchspannende α -Helix folgt. Dies lässt vermuten, dass sie an der inneren Mitochondrien-Membran lokalisiert ist (Love *et al.* 2003). Die kleinste

Isoform stellt die kurze OGT (sOGT, engl. *short*) dar. Sie besitzt nur zweieinhalb TPRs und ist, wie die ncOGT, ubiquitär in der Zelle lokalisiert. Es gibt Hinweise darauf, dass sie die Zelle vor Wachstumsfaktor-Entzug-vermitteltem Tod schützt (Fletcher *et al.* 2002). Alle OGT-Formen zeigen starke Expressionsniveaus in Blutzellen, einschließlich T- und B-Zellen (Lazarus *et al.* 2006). Demgegenüber ist die Expression der einzelnen Isoformen weitestgehend Gewebe-abhängig. ncOGT wird in allen Geweben gebildet, mit niedrigen Konzentrationen in Niere und hohen in Gehirn, Pankreas und Uterus (Kreppel *et al.* 1997). sOGT wird vermehrt in Niere, Leber, Muskelgewebe, Thymus, Speicheldrüse, Ovarien, Tonsillen, der Plazenta und im Pankreas gebildet. Die Gewebe-Verteilung der mOGT wurde bislang nicht untersucht.

OGT selbst ist O-GlcNAc-modifiziert und phosphoryliert. Die genauen Positionen sind bislang unbekannt. Wells *et al.* konnten über Ko-Immunpräzipitation einen Proteinphosphatase I-OGT-Komplex nachweisen (Wells *et al.* 2004). Auch dies deutet auf den engen funktionellen Zusammenhang zwischen Glykosylierung und Phosphorylierung hin. Die Expression von funktioneller OGT in mehrzelligen Organismen ist lebensnotwendig. Dies zeigt sich an der embryonalen Letalität von OGT^{-/-}-Mäusen (Shafi *et al.* 2000).

O-GlcNAcase

OGA existiert in zwei Isoformen. Während die längere Version zytoplasmatisch und nukleär lokalisiert ist, findet man die kurze Variante hauptsächlich im Zellkern (Comtesse *et al.* 2001). Beide Isoformen besitzen eine O-GlcNAcase-Aktivität. Die längere Form teilt sich in drei funktionelle Abschnitte auf. Am C-Terminus trägt sie eine Histon-Acetyltransferase-Aktivität, am N-Terminus eine β -N-Acetylglukosaminidase und im Mittelsegment eine Caspase-Spaltstelle. Vor allem in apoptotischen Zellen spaltet Caspase 3 an dieser Position, wodurch die O-GlcNAcase-Aktivität nicht beeinflusst wird (Comtesse *et al.* 2001; Toleman *et al.* 2004).

1.1.2 Biologische Bedeutung von O-GlcNAc

Vor allem während der letzten zehn Jahre wurde der O-GlcNAc-Modifizierung mehr und mehr Aufmerksamkeit geschenkt. Der Grund, weshalb diese essenzielle und abundante PTM so lange übersehen wurde, begründet sich vor allem in den technischen Schwierigkeiten der Detektion dieser dynamischen, substöchiometrischen und labilen Modifizierung. Trotz dieser Hürden konnte gezeigt

werden, dass der O-GlcNAc-Modifizierungsstatus hunderter Proteine als Reaktion auf den Nährstoff-Status oder als Antwort auf verschiedenste Stress-Stimuli variiert.

Viele Studien belegen, dass der O-GlcNAc-Modifizierung wichtige Rollen in Bereichen wie Transkription, Zellzyklus, der zellulären Stress-Antwort und der Ubiquitin-Proteasom-Degradation zugeschrieben werden können.

Regulation von Transkriptionsfaktoren durch O-GlcNAc

Viele Transkriptionsfaktoren konnten in der Vergangenheit als O-GlcNAc-modifizierte Proteine identifiziert werden. Die Funktion der Modifizierung umfasst die Regulation der Stabilität, Lokalisierung, Protein-Protein-Interaktion und DNS-Bindungsfähigkeit von Transkriptionsfaktoren (Ozcan *et al.* 2010).

Tabelle 1-1: Regulation von Transkriptionsfaktoren über monomere O-GlcNAc-Modifizierungen. Aufgelistet sind einige gut untersuchte Beispiele zur Regulation von Transkriptionsfaktoren über O-GlcNAc. Weitere Beispiele sind in Özcan *et al.* 2010 zusammengefasst.

Art der Regulation	Beispiel-Protein	Position	Quelle
Protein-Stabilität	P53 (<i>Tumor supressor protein 53</i>); Die O- GlcNAc-Modifizierung führt zur Inhibierung von Cop9-Signalosom-assoziierter Phosphorylierung an Thr155 und zur Stabilisierung unter Stress-Bedingungen und inhibiert die Mdm2-vermittelte Ubiquitinierung von p53.	Ser149	(Yang, W. H. <i>et al.</i> 2006)
Protein-Protein-	NF κ B (nuclear factor kappa-B);	Thr322,	(Ghosh und Karin 2002: Li O und
Interaction	Glykosyllerung an Thr 352 inhibiert Interaktion mit I κ B, bewirkt Transport in Nukleus und Aktivierung von Zielgenen.	101352	2002; L1, Q. und Verma 2002)
Nukleo-	NFATc1 (nuclear factor of activated T-cells,	unbekannt	(Rao et al. 1997;
zytoplasmatischer	cytoplasmic, calcineurin-dependent 1); T-		Golks <i>et al</i> . 2007)
Transport	Zell-Aktivierung führt zu Anstieg von U-		
	Translokation in den Zellkern.		
Regulation der	Pdx-1 (pancreatic/duodenal homeobox 1);	unbekannt	(Gao <i>et al.</i> 2003;
DNS-	Zunahme von O-GlcNAc führt zu erhöhter		Andrali et al. 2008)
Bindungsaktivität	DNS-Bindungsaktivität an Insulin-Promotor		
	und bewirkt Produktion von Insulin.		

Einfluss der O-GlcNAc-Modifizierung auf Krankheiten

In den letzten Jahren häufen sich Hinweise darauf, dass Dysfunktionen im zellulären O-GlcNAc-Haushalt mit der Entwicklung einer Vielzahl von Krankheitsbildern assoziiert sind. So kann der

O-GlcNAc-Modifzierung eine Rolle bei der Entwicklung von Diabetes mellitus, bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer und Krebs zugeschrieben werden.

O-GlcNAc und Diabetes mellitus

Der Zusammenhang zwischen O-GlcNAc und Diabetes ist einer der am intensivsten studierten Aspekte dieser PTM. Die Qualität und Quantität an O-GlcNAc-Modifizierungen kann sich als Reaktion auf variierende Glukose-Konzentrationen stark ändern. Erhöhte Glukose-Konzentrationen ziehen eine Vielzahl an zellulären Reaktionen nach sich. In β-Zellen bewirken sie vermehrte O-GlcNAc-Modifizierungen der Transkriptionsfaktoren Pdx-1 und NeuroD1, woraufhin diese aktiviert werden und eine verstärkte Insulin-Synthese auslösen (Petersen *et al.* 1998; Gao *et al.* 2003; Andrali *et al.* 2008). Weitere Folgen sind chronisch erhöhte Mengen O-GlcNAc-modifizierter Proteine, die eine gestörte Insulin-Sekretion bewirken und an der Ausbildung von Insulin-Resistenz und der daraus resultierenden Entstehung von Diabetes beteiligt sind. Eines der vermehrt O-GlcNAc-modifizierten Proteine ist die Glykogensynthase. Deren Hyperglykosylierung bewirkt einen Rückgang ihrer enzymatischen Aktivität und eine damit verbundene verminderte Glykogen-Synthese (Parker *et al.* 2003). Außerdem konnte durch die Behandlung von 3T3-L1 Adipozyten mit dem O-GlcNAcase-Inhibitor PUGNAc und anschließender Stimulation mit Insulin gezeigt werden, dass ein global erhöhtes Maß an O-GlcNAc-Modifizierungen zu einer verringerten Glukose-Aufnahme und zur Ausbildung von Insulin-Resistenz führt (Vosseller *et al.* 2002).

Ein weiterer Bereich, der die O-GlcNAc-Modifizierung mit Diabetes in Zusammenhang bringt, umfasst die Regulation der Transkription von Genen des Glukose-Signalweges. Als Reaktion auf einen hohen Glukose-Spiegel in der Zelle und den damit verbundenen gesteigerten Konzentrationen der O-GlcNAc-modifizierten Transkriptionsfaktoren FoxO1, SP1 und CREB kommt es zu einer vermehrten Transkription von Glukoneogenese-Genen (Jackson und Tjian 1988; Dentin *et al.* 2008; Housley *et al.* 2008; Housley *et al.* 2009). Die überhöhte transkriptionelle Aktivität führt zu Glukose-Toxizität. Diese Effekte können über eine Herabregulation der OGT durch siRNS, die Expression einer dominant negativen Version der OGT oder Überexpression der OGA umgekehrt werden.

Lehmann *et al.* konnten im Jahr 2005 zeigen, dass die Prävalenz zu Diabetes Typ 2 eines Großteils der mexikanischen Bevölkerung auf einen einzel-Nukleotid-Polymorphismus (SNP, engl. *single nucleotide polymorphism*) des O-GlcNAcase-Gens MGEA5 zurückzuführen ist (Lehman *et al.*

2005). All diese Ergebnisse lassen einen engen Zusammenhang zwischen O-GlcNAc und der Ausbildung von Diabetes vermuten.

O-GlcNAc und Neurodegeneration

Die Rolle von O-GlcNAc im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer ist von besonderem Interesse. Vor allem in Neuronen findet man OGT- und OGA-Transkripte in hoher Abundanz (Lubas *et al.* 1997). Von Alzheimer betroffene Gehirnregionen zeigen extrazelluläre β-Amyloid-Plaques und betroffene Neuronen akkumulieren Aggregate des Mikrotubuli-assoziierten Proteins tau. Beide Proteine sind O-GlcNAc-modifiziert. Tau ist in der Mikrotubili-Bindungsdomäne stark glykosyliert mit einer Stöchiometrie von 4 mol GlcNAc/mol tau (Arnold *et al.* 1996). Gezielte OGT-*knockouts* in Gehirnen führen zu hyperphosphoryliertem tau und neuronalem Tod, während eine Inhibition von OGA in Ratten eine reduzierte Phosphorylierung von tau bewirkte (O'Donnell *et al.* 2004; Yuzwa *et al.* 2008). In den Gehirnen von Alzheimer-Patienten findet man glykosyliertes tau verstärkt in nicht-aggregierten Bereichen, während man hyperphosphoryliertes tau hauptsächlich in aggregierten Fraktionen nachweisen konnte (Liu, F. *et al.* 2004). Einen weiteren Hinweis auf den Zusammenhang zwischen der Entstehung von Alzheimer und O-GlcNAc liefert die Tatsache, dass der Glukose-Metabolismus in Gehirnen von Alzheimer-Patienter-Patienten gestört ist.

1.1.3 Strategien zum Nachweis von O-GlcNAc-Modifizierungen an Proteinen

Der spezifische Nachweis von O-GlcNAc stellt auch 25 Jahre nach seiner Entdeckung eine der größten Hürden dar. Die Gründe hierfür liegen in der dynamischen, labilen und substöchiometrischen Natur dieser PTM. Es wurden viele Strategien entwickelt, um O-GlcNAc-modifizierte Proteine zu detektieren. Sie lassen sich grob in biochemische/immunologische und massenspektrometrische Nachweismethoden unterteilen, wobei sich beide Bereiche häufig überschneiden.

Biochemische/immunologische Nachweismethoden von O-GlcNAc Radioaktive Markierung mit [H³]-Galaktose

Die am häufigsten angewandte Methode zur Detektion monomerer N-Acetylglukosamin-Reste ist die Galaktosyltransferase-katalysierte *in-vivo-* oder *in-vitro-*Addition von radioaktiver [H³]Galaktose

 $([H^3]Gal)$ an einen endständigen O-GlcNAc-Rest (Torres und Hart 1984). Die markierten Proteine können über Autoradiographie visualisiert werden. Um die Position der O-GlcNAc-Modifizierung zu bestimmen, werden die markierten Proteine verdaut, chromatographisch aufgetrennt, einzelne Fraktionen entsprechend ihrer Radioaktivität ausgewählt und modifizierte AS über Edmann-Sequenzierung identifiziert. Mit dieser Methode war es 1984 erstmals gelungen, zytoplasmatisch und nukleär lokalisierte, O-GlcNAc-modifizierte Proteine nachzuweisen (Torres und Hart 1984). Damals wurde das entstandene $[H^3]Gal \beta 1$ -4GlcNAciol über β -Eliminierung abgespalten, das freie Disaccharid chromatographisch separiert und über Radioaktivitätsmessung detektiert. Prinzipiell lässt sich diese Methodik auch für massenspektrometrische Analysen adaptieren. Die Verwendung von radioaktivem Material stellt aber einen großen Nachteil dieser Strategie dar.

Nachweis von O-GlcNAc-Modifizierungen durch Antikörper

Eine andere Strategie stellt die Detektion mit O-GlcNAc-spezifischen monoklonalen Antikörpern (AK) dar. Bis vor kurzem existierten nur vier solcher AK: CTD110.6 (Comer *et al.* 2001), RL2 (Snow *et al.* 1987), MA1-076 und MA1-072 (Wells *et al.* 2002; Sumegi *et al.* 2003). CTD110.6 zeigt hierbei das breiteste Substratspektrum. Die AK ermöglichen die Detektion O-GlcNAc-modifizierter Proteine über Westernblot-Analysen und die Anreicherung solcher über Immunpräzipitation. Bei der Anwendung treten aber häufig Probleme hinsichtlich der Spezifität und Empfindlichkeit auf. Vor kurzem wurden neue monoklonale AK vorgestellt, welche ein breiteres Spektrum O-GlcNAc-modifizierter Proteine detektieren sollen (Teo *et al.* 2010). Ob diese hinsichtlich ihrer Spezifität und Empfindlichkeit den bereits etablierten AK überlegen sind, müssen zukünftige Studien zeigen.

Nachweis von O-GlcNAc-Modifizierungen durch Lektine

O-GlcNAc-modifizierte Proteine können über Lektine detektiert und angereichert werden. Lektine sind pflanzliche Agglutinine, welche spezifisch an bestimmte Kohlenhydrate binden. Für die Detektion und Anreicherung O-GlcNAc-modifizierter Proteine hat sich in den letzten Jahren vor allem Weizenkeim-Agglutinin (WGA, engl. *wheat germ agglutinine*) bewährt. Allerdings zeigt es aufgrund von vier Zuckerbindungsstellen eine höhere Affinität zu Polysacchariden mit endständigem N-Acetylglukosamin als zu monomerem O-GlcNAc.

Chemoenzymatische Markierung mit N-Azidogalaktosamin zum Nachwies von O-GlcNAc

Eine alternative zur radioaktiven Markierung stellt die chemoenzymatische Markierung dar. O-GlcNAc-Modifizierungen komplexer Protein-Gemische oder aufgereinigter Proteine werden im ersten Schritt der sogenannten *ClickiT*TM-Reaktion (Invitrogen) enzymatisch durch die Zugabe von UDP-N-Azidogalaktosamin (UDP-GalNAz) und der β -1,4-Galaktosyltransferase-Mutante Gal-T1 (Y289L) mit GalNAz elongiert. Im zweiten Schritt wird über eine Cu(I)-katalysierte Zykloaddition ("*click*"-Reaktion) ein biotinyliertes oder fluoreszenzmarkiertes Alkin an die Azid-Gruppe des Galaktose-Restes gekoppelt (Rostovtsev *et al.* 2002). Die so markierten Proteine können anschließend über den gebundenen Fluoreszenz-Farbstoff oder eine Chemilumineszenz-Reaktion (CL) mit Streptavidinperoxidase nachgewiesen werden.

Massenspektrometrische Nachweismethoden von O-GlcNAc

Für den Nachweis posttranslationaler Modifizierungen werden zunehmend Massenspektrometriebasierte Methoden entwickelt. Über massenspektrometrische Messungen ist es nicht nur möglich, die Art der PTM, sondern auch ihre genaue Position im AS-Gerüst eines Peptides zu identifizieren.

Um massenspektrometrisch PTMs, wie Phosphorylierungen oder O-GlcNAc nachzuweisen, ist es üblich, das zu untersuchende Protein enzymatisch in einzelne Peptide zu spalten. Die zu diesem Zweck am häufigsten verwendete Endoproteinase ist Trypsin, welche spezifisch Peptid-Bindungen C-terminal zu Lys- und Arg-Resten spaltet. Da aber nicht alle tryptischen Peptide über MS identifiziert werden können, seien sie zu kurz oder zu lang und damit außerhalb des idealen Mess-Bereiches oder zeigen ein schlechtes Ionisierungsverhalten, bietet es sich an, unterschiedliche Proteasen zu verwenden, um eine möglichst große Sequenzabdeckung des zu untersuchenden Proteins zu erhalten. Andere häufig verwendete Proteasen sind Chymotrypsin, AspN, GluC und LysC.

Grundprinzip der Massenspektrometrie mit Schwerpunkt auf MALDI TOF/TOF MS und MSMS

Das Grundprinzip der Massenspektrometrie (MS) besteht darin, organische oder anorganische Substanzen zu ionisieren, sie anhand ihres Masse/Ladung-Verhältnisses (m/z, engl. mass/charge ratio) im Hochvakuum aufzutrennen und anschließend zu detektieren. Ein Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle zur Erzeugung von Gasphasen-Ionen, einem Massenanalysator, in dem die Ionen nach ihrem m/z-Wert aufgetrennt werden und einem Detektor. Es existieren

unterschiedlichste Kombinationen von Ionenquellen, Massenanalysatoren und Detektoren. Die auf dem Gebiet der Peptid-Analytik am häufigsten verwendeten Ionisierungsmethoden sind Elektrosprayionisierung (ESI, engl. *electro spray ionisation*) und Matrix unterstützte Laser Desorption/Ionisierung (MALDI, engl. *matrix assisted laser desorption/ionisation*). Erst durch die Einführung dieser schonenden Ionisierungsverfahren Ende der 1980er Jahre war es möglich, auch empfindliche Moleküle wie Peptide und Proteine in die Gasphase zu überführen ohne sie während der Ionisierung zu zerstören (Karas und Hillenkamp 1988).

In der MALDI-Flugzeit MS (TOF, engl. *time of flight*) wird die zu analysierende Probe in eine Matrix, in der Regel α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure (CHCA) oder 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB), eingebettet (Matrix-Konzentration>>Proben-Konzentration) und auf einen MALDI-Probenteller aufgetragen. Nach der Verdunstung des Lösungsmittels kommt es zur Ko-Kristallisierung der Proben- und Matrix-Moleküle. Die Matrix wird durch kurze intensive Laserimpulse angeregt, wodurch Matrix- und Proben-Moleküle in die Gasphase überführt werden. In der Gasphase kommt es zu einem Protonentransfer von Matrix- auf Proben-Moleküle (Karas und Hillenkamp 1988). Diese vereinfachte Protonentransfer-Theorie wurde in den letzten Jahren durch die Formulierung des *Cluster*ionisationsmodells oder der "*Lucky Survivor*"-Theorie modifiziert (Karas *et al.* 2000). Durch ein angelegtes elektrisches Feld werden die nun protonierten Analyt-Ionen beschleunigt und in einer feldfreien Driftstrecke (Flugzeitrohr) nach ihrem m/z-Verhältnis aufgetrennt. Über den Detektor werden die ankommenden Ionen nach ihrem m/z-Wert und ihrer Häufigkeit registriert und über ein *Peak*-Spektrum ausgegeben. Das m/z-Verhältnis ist dem Quadrat der Zeit proportional, wodurch es möglich ist, bei bekannter Ladung, Spannung und Flugstrecke, über die Flugzeit die Masse einer ionisierten Substanz zu berechnen.

Tandemmassenspektrometrie

Über tandemmassenspektrometrische Messungen (MSMS) ist es möglich, die AS-Sequenz eines Peptides zu bestimmen. Die im MALDI-TOF/TOF MSMS verwendeten Fragmentierungsmethoden sind der metastabile Zerfall (PSD, engl. *post source decay*) und der stoßaktivierte Zerfall (CID, engl. *collision induced fragmentation*), wobei zwischen *low* und *high energy* CID unterschieden wird. Während der *low energy* CID-Fragmentierung werden die im Hochvakuum beschleunigten Analyt-Ionen in die Kollisionskammer geleitet, wo sie mit neutralen Gasmolekülen (z.B. Argon, Stickstoff, Luft...) zusammenstoßen. Hierbei wird ein Teil der kinetischen Energie in interne Vibrationsenergie

umgewandelt. Der Aufprall bewirkt Brüche des Analyten an den schwächsten Bindungsstellen. Peptide fragmentieren in erster Linie an ihren Peptid-Bindungen, was zur Ausbildung von C-terminalen y-Ionen und N-terminalen b-Ionen führt (Abb. 1-2) (Roepstorff und Fohlman 1984).



Abbildung 1-2: Massenspektrometrische Fragmentierung von Peptiden. Während der Fragmentierung im MALDI-TOF/TOF MSMS entstehen vorwiegend b- und y-Ionen. Während der Radikal-basierten ECD und ETD-Fragmentierung entstehen vorwiegend c- und z-Ionen.

Der hier verwendete Proteomics Analyzer 4700 bietet die Möglichkeit der high energy CID (Vestal und Campbell 2005). Beiden Fragmentierungsmethoden gemein ist, dass ein vorher im MS detektierter Analyt mit einem bestimmten m/z-Wert über den TIS (engl. timed ion selector) selektiert wird und Ionen mit abweichenden m/z-Werten über ein angelegtes Spannungsfeld am Weiterflug gehindert werden. Metastabile Fragment-Ionen, die während des Fluges durch das Hochvakuum gebildet werden (PSD-Fragmente), erreichen den TIS zur selben Zeit wie das Vorläufer-Ion. Dies ist möglich, da die Geschwindigkeit eines Ions von der initialen Beschleunigung abhängt. Vor dem Durchfliegen der Kollisionskammer werden die Ionen über ein gegensätzlich geladenes Spannungsfeld abgebremst, wodurch die PSD-Bruchstücke, welche eine kleinere kinetische Energie als das zu fragmentierende Vorläufer-Ion besitzen, aussortiert werden. Der selektierte Precursor erreicht die Kollisionskammer mit einer sehr hohen Energie (≥ 1 kV) wodurch im Vergleich zur *low* energy CID nur wenige Kollisionen nötig sind (< 10), um eine ausreichende Fragmentierung des Vorläufer-Ions zu induzieren. Vor dem Erreichen des zweiten Flugzeit-Rohres werden die high energy CID-Fragmente und die nichtfragmentierten Precursor-Ionen erneut beschleunigt. PSD-Fragmente, die im zweiten Flugzeitrohr entstehen, werden durch den sogenannten metastable supressor entfernt. Beim Ankunftszeitpunkt der Vorläufer-Ionen wird an diesen Linsen eine Spannung angelegt, wodurch der Precursor größtenteils und dessen PSD-Fragmente fast vollständig abgelenkt werden bevor sie den Detektor erreichen. Ein großer Vorteil der high energy CID gegenüber der low energy CID ist die Erzeugung von alternativen Fragment-Ionen. Durch die

Abspaltung von Seitenketten-Gruppen ist es möglich zwischen isobaren Aminosäuren wie Leucin und Isoleucin zu unterscheiden (Vestal und Campbell 2005).

wurden letzten Jahren alternative In den Radikal-basierte massenspektrometrische Fragmentierungsmethoden - die Elektroneneinfang-Dissoziation [ECD, engl. electron capture dissoziation (Zubarev et al. 2000)] und Elektronentransfer-Dissoziation [ETD, engl. electron transfer dissoziation (Syka et al. 2004)] - vorgestellt. Durch diese ist es möglich, labile PTMs, wie Phosphatund O-GlcNAc-Modifizierungen direkt zu bestimmen. Im Gegensatz zur CID bleibt die O-Phosphatoder O-glykosidische Bindung unter ECD- und ETD-Bedingungen intakt. Bei der ECD-Fragmentierung werden thermale Elektronen direkt auf den Analyten übertragen was zu Brüchen an peptidischen N-Cα-Bindungen und demzufolge zur Bildung von N-terminalen c- und C-terminalen z-Ionen führt. Beim Transport durch Wechselspannungsfelder, wie sie beispielsweise für den Ionen-Transfer über Quadrupole zu Ionenfallen verwendet werden, verlieren solche thermalen Elektronen (> 1 eV) aber zu schnell an Energie. Aus diesem Grund werden bei der ETD-Fragmentierung die niedrigenergetischen thermalen Elektronen an Transporter wie Fluoranthen unter der Bildung von Fluoranthen-Radikal-Anionen gebunden. Im gebundenen Zustand können die thermalen Elektronen über Wechselspannungsfelder zur Ionenfalle transportiert werden, wo sie an die zu fragmentierenden Vorläufer-Ionen abgegeben werden und eine der ECD äquivalente Fragmentierung bewirken. Allerdings sind nur einige Massenspektrometer zur ECD- und ETD-Fragmentierung imstande. Hohe Ladungszustände der Analyten sind eine Voraussetzung für eine effiziente Fragmentierung. Somit sind diese Methoden nur an speziell ausgerüsteten ESI-Massenspektrometern verfügbar.

Massenspektrometrischer Direktnachweis von O-GlcNAc

Die direkte massenspektrometrische Analyse von O-GlcNAc-Modifizierungen stellt eine besondere Herausforderung dar. Aufgrund des substöchiometrischen Vorkommens ist es nötig, O-GlcNAcmodifizierte Proteine/Peptide vor der Analytik anzureichern. Für phosphorylierte Proteine/Peptide existieren bereits gut etablierte Methoden, welche eine effektive und spezifische Anreicherung ermöglichen, z.B. die *immobilized metal affinity chromatographie* (IMAC) und TiO₂ (Andersson und Porath 1986; Pinkse *et al.* 2004).

Ähnlich effektive Methoden zur direkten Anreicherung O-GlcNAc-modifizierter Proteine/Peptide existieren bislang noch nicht. Die Verwendung von O-GlcNAc-spezifischen AK oder Lektinen weisen große Nachteile hinsichtlich ihrer Spezifität und Effektivität auf. Aufgrund der Eigenschaft

von WGA, Polysaccharide stärker zu binden als monomere GlcNAc-Reste, entwickelten Vosseller *et al.* die schwache Lektin-Affinitätschromatographie (LWAC, engl. *lectin weak affinity chromatography*). Dabei wird eine Probe über eine bis zu 12 m lange, mit WGA-Agarosekugeln gefüllte Teflonsäule aufgetrennt. Aufgrund der schwächeren Bindung von monomer glykosylierten Proteinen/Peptiden eluieren diese zwischen unmodifizierten und Polysaccharid-modifizierten Proteinen/Peptiden und können so angereichert werden. Über ECD-Fragmentierung konnten anschließend 65 O-GlcNAc-modifizierte Peptide sequenziert und identifiziert werden (Vosseller *et al.* 2006).

Ein weiterer Umstand, der die direkte massenspektrometrische Analyse O-GlcNAc-modifizierter Proteine/Peptide erschwert, ist die Labilität der β -O-glykosidischen Bindung unter CID-Bedingungen. Während der CID-Fragmentierung wird die Sauerstoff-Zucker-Bindung bevorzugt gegenüber der Peptid-Bindung gespalten (Greis *et al.* 1996; Chalkley und Burlingame 2003). Dies führt nicht nur zum Verlust des Ser/Thr-gebundenen GlcNAc-Restes, sondern bewirkt zusätzlich eine ineffiziente Fragmentierung des Peptid-Rückgrades, was eine spätere Identifizierung des zu untersuchenden Peptides nahezu unmöglich macht. Durch die Abspaltung des N-Acetylglukosamins ist es außerdem meist nicht mehr möglich, die Position der Modifizierung zu bestimmen.

Den Verlust des Zucker-Restes kann man aber auch nutzen. In MS³-Experimenten werden die Fragment-Spektren der MSMS-Läufe nach spezifischen O-GlcNAc-Indikator-Ionen durchsucht. Diese sind das O-GlcNAc-Oxoniumion (m/z = 204) und das Neutralverlust-Ion des fragmentierten Vorläufers (m/z = [m/z] des Vorläufer-Ions] – 203 Da). Die Neutralverlust-Ionen können in einem weiteren Schritt fragmentiert werden, was in gut auswertbaren MSMS resultiert. Enthält ein Peptid aber mehr als einen Ser- oder Thr-Rest ist eine Positionsbestimmung der O-GlcNAc-Modifizierung nicht möglich.

Chemoenzymatische Markierung zum massenspektrometrischen Nachweis von O-GlcNAc

In den letzten zehn Jahren wurden viele chemoenzymatische Methoden zum Nachweis von O-GlcNAc-Modifizierungen vorgestellt. Allen gemein ist der erste Schritt - die enzymatische Addition eines Galaktosyl-Derivates an N-Acetylglukosamin-Reste.

Durch die enzymatische Derivatisierung von O-GlcNAc-Resten mit Galaktose entsteht N-Acetyllaktosamin. Das Lektin *Ricinus cummunis* (RCA1) besitzt eine hohe Affinität zu N-Acteyllaktosamin, was ein effizientere Anreicherung O-GlcNAc-modifizierter Peptide ermöglicht

als WGA (Carapito *et al.* 2009). Diese Methode wurde bislang ausschließlich an Modell-Peptiden und dem Protein α -Crystallin, ein häufig verwendetes Standard-Protein zur Detektion von O-GlcNAc-Modifizierungen, angewendet.

Bei allen anderen Methoden folgt auf den enzymatischen Derivatisierungsschritt die chemische Kopplung eines Biotin-Restes, welcher eine hochspezifische Affinitätsanreicherung an Streptavidin ermöglicht (Khidekel *et al.* 2007; Wang, Z. *et al.* 2009). Ein Nachteil dieser Strategie ist die Inkorporation einer sehr großen Markierung (>700 Da) und das oft als problematisch beschriebene Lösen der Biotin-Streptavidin-Bindung. Durch das Einführen einer UV-labilen Verbindungsgruppe zwischen dem Galaktosyl-Derivat und dem Biotin-Rest konnte diese Hürde elegant umgangen werden (Wang, Z. *et al.* 2010). Das Problem der labilen β -O-glykosidischen Bindung, was die Verwendung von ECD/ETD-fähigen Massenspektrometern voraussetzt, besteht hingegen noch immer (Khidekel *et al.* 2007; Wang, Z. *et al.* 2009).

Perjodat-Oxidation

Die ursprünglich zur Identifizierung und Quantifizierung N-glykosylierter Proteine vorgestellte Methode der Perjodat-Oxidation von Zucker-Resten und anschließender Hydrazid-Anreicherung (Zhang, H. et al. 2003) wurde vor kurzem auf O-GlcNAc-modifizierte Proteine angewendet (Klement et al. 2010). Zunächst wird der GlcNAc-Ring durch Perjodat-Oxidation an der C3- und C4-Position zu einem Dialdehyd-Derivat oxidiert. Anschließend kann der oxidierte Zucker an Trägermaterial-gekoppeltes Hydrazid gebunden und im Folgenden via β-Eliminierung vom Trägermaterial entfernt werden. Durch die Umwandlung der modifizierten Ser/Thr-Reste in ihre Dehydroderivate kann man die genaue Position der O-GlcNAc-Modifizierung im Fragment-Spektrum nachweisen. Die Derivatisierung unmodifizierter Ser/Thr-, sowie alkylierter Cys-Reste kann allerdings zu falschpositiven Aussagen führen. Aus diesem Grund wurden die gebundenen Peptide durch die Spaltung der Hydrazon-Bindung eluiert. Dies machte wiederum die Verwendung eines ETD-fähigen Massenspektrometers nötig. Das Ziel der Untersuchungen war, O-GlcNAc-Modifizierungen an 26S-Proteasomen in Drosophila melanogaster zu identifizieren. Zwar wurden diese Modifizierungen nicht an UE von 20S- oder 19S-Komplexen, dafür aber an einigen Proteasom-Interaktionspartnern, wie HSP70 und der Ubiquitin-spezifischen Protease Faf identifiziert (Klement et al. 2010).

β-Eliminierung/Michael Addition-basierte Nachweismethoden

Die Strategie der β -Eliminierung zur Abspaltung β -O-gebundener Modifizierungen an Ser- und Thr-Resten wurde bereits Mitte der 1980er Jahre zur Identifizierung von Phosphorylierungen vorgestellt (Mega *et al.* 1986). Etwa zehn Jahre später fand die Methode erstmals Anwendung an glykosylierten Standard-Peptiden (Greis *et al.* 1996). Unter milden basischen Bedingungen werden die Ser/Thrgebundenen O-GlcNAc-Reste eliminiert, wodurch Dehydroderivate der modifizierten AS entstehen (Abb. 1-3). Greis *et al.* konnten zeigen, dass die β -Eliminierung eines O-GlcNAc-modifizierten Peptides doppelt so effektiv abläuft wie an seinem N-Acetylgalaktosamin-modifizierten (O-GalNAc) Sequenzanalogon (Greis *et al.* 1996). Über die entstandenen Dehydroderivate von Serin und Threonin war es möglich, die Position der O-GlcNAc-Modifizierung massenspektrometrisch zu bestimmen. Die Funktionalität dieser Methode konnte zwar an Modell-Peptiden gezeigt werden, zur Detektion O-glykosylierter Peptide in komplexen Proben fand sie jedoch keine Anwendung. Erst durch die Kombination des β -Eliminierungsprotokolls und der Michael Additionsreaktion mit unterschiedlichen S- und N-Nukleophilen war es möglich, O-Phosphorylierungs- (Goshe *et al.* 2001; Oda *et al.* 2001) und O-Glykosylierungsstellen (Wells *et al.* 2002) aus komplexen Protein-Proben zu identifizieren (Abb. 1-3).



Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der β -Eliminierung/Michael Addition mit SH-Nukleophilen an Ser-O-GlcNAc. Das β -O-glykosidisch gebundene N-Acetylglukosamin wird unter milden basischen Bedingungen von Serin, unter Bildung von Dehydroalanin und freiem GlcNAc eliminiert. Während der Michael Addition kommt es durch den nukleophilen Angriff des Schwefels auf den α/β -ungesättigten Kohlenstoff des Dehydroderivates zur Bildung von Serin-S-X. X steht hierbei für eine beliebige chemische Gruppe, die je nach Anforderung an die Methodik (Affinitätsanreicherung, relative Quantifizierung, Ionisierungsförderung...) angepasst werden kann.

Als S- und N-Nukleophile dienten unterschiedlichste chemische Gruppen. Im Bereich der Phospho-Protein-Analytik sollten die nukleophilen Gruppen häufig die Ionisierungseigenschaften eines Phospho-Peptides verbessern oder eine relative Quantifizierung zwischen zwei Zellzuständen ermöglichen (Goshe *et al.* 2001; Klemm *et al.* 2004).

Wells *et al.* stellten im Jahr 2002 die BEMAD-Methode (β-Eliminierung/Micheal Addition mit Dithiothreitol) vor. Die Addition des Dithiothreitols (DTT) hatte zwei entscheidende Vorteile

gegenüber den immunologischen Anreicherungsmethoden und dem massenspektrometrischen Direktnachweis. Die, durch die Anlagerung des DTTs an den α/β -ungesättigten Kohlenstoff der Ser/Thr-Dehydroderivate, entstandene C-S-Bindung, ist unter CID-Bedingungen stabil. Dadurch war es möglich, die exakte O-GlcNAc-Modifizierungsposition zu identifizieren. Außerdem ermöglichte die freie Thiol-Gruppe des DTTs eine affinitätschromatographische Anreicherung derivatisierter Peptide an Thiolsepharose (Wells *et al.* 2002; Vosseller *et al.* 2005).

Die Derivatisierungseffizienz an O-GlcNAc-modifizierten AS nimmt nach folgender Reihenfolge ab: Ser > Thr > Ser-Pro > Thr-Pro (Wells et al. 2002). Neben dem spezifischen Umsatz an glykosylierten und phosphorylierten Ser/Thr-Resten, unterliegen auch sulfonierte Ser/Thr-, alkylierte und nichtalkylierte Cys-, Met- und nichtmodifizierte Ser/Thr-Reste (Umsatz maximal 2%) der β-Eliminierung/Michael Additionsreaktion. Aus diesen Gründen ist es essenziell, die zu analysierenden Proben entsprechend vorzubereiten. Der Umsatz an phosphorylierten AS kann durch die Behandlung der Proben mit Phosphatasen und der an Cys- und Met-Resten durch deren Oxidation verhindert werden. Die Derivatisierung unmodifizierter Ser/Thr-Reste macht es nötig eine relative Quantifizierungsstrategie zwischen deglykosylierter und glykosylierter Probe zu verfolgen. Ein unspezifischer Umsatz von 2 % scheint zunächst nicht störend, bedenkt man aber, dass ein Protein meist zu maximal 2 - 10 % glykosyliert vorliegt, ergibt sich folgendes Rechenbeispiel: Werden 100 pmol eines zu 2 % glykosylierten Proteins/Peptides auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt, eine Probe deglykosyliert und anschließend beide Proben derivatisiert, so enthält die deglykosylierte Probe im ungünstigsten Fall 1 pmol und die glykosylierte 2 pmol derivatisertes Protein/Peptid. Nach der Affinitätsanreichung kann man unmöglich feststellen, ob es sich bei dem resultierenden MS-Signal um ein spezifisch oder unspezifisch umgesetztes Protein/Peptid gehandelt hat.

Im Jahr 2005 stellten Vosseller *et al.* eine überarbeitete BEMAD-Strategie vor. Durch die Verwendung von leichtem DTT-d0 und stabil deuteriertem DTT-d6, war es ihnen möglich, zwischen zwei Proben innerhalb eines Massenspektrums relativ zu quantifizieren (Vosseller *et al.* 2005). Die zu untersuchende Probe wurde vor der Derivatisierung geteilt, eine Hälfte enzymatisch deglykosyliert und eine Probe unbehandelt belassen. Die glykosylierte Probe wurde mit DTT-d0 und die deglykosylierte mit DTT-d6 umgesetzt. Anschließend wurden die Proben wieder vereint, und es war möglich, zwischen unspezifischen und spezifischen BEMAD-Produkten zu unterscheiden. Spezifische Produkte zeigten ein leicht/schwer-Verhältnis (L/H) > 2. Für unspezifische Derivate lag

das L/H-Verhältnis bei $1 \pm 0,5$. Gezeigt wurde die Effektivität der Methode für Protein-Phosphorylierungen und an einem synthetischen O-GlcNAc-Peptid. Hauptsächlich wurde die quantitative BEMAD-Methode entwickelt, um Proteine über die Derivatisierung von Cys-Resten relativ zu quantifizieren. Obwohl diese unspezifischen Nebenreaktionen bekannt sind, erscheinen noch immer Publikationen, in denen die BEMAD-Strategie ohne relative Quantifizierung angewendet wird (Hedou *et al.* 2009; Klement *et al.* 2010).

Durch die Kombination der BEMAD-Methode mit chemoenzymatischen Markierungsstrategien, wie $ClickiT^{TM}$ ergeben sich völlig neue Möglichkeiten in der O-GlcNAc-Analytik. Wang *et al.* verwendeten diese kombinierte Strategie zum Identifizieren potentieller Diabetes-Biomarker, indem sie Erythrozyten von diabetischen und gesunden Patienten in Hinblick auf relative Unterschiede im O-GlcNAc-Gehalt von Proteinen verglichen (Wang, *Z. et al.* 2009). Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals eine O-GlcNAc-Modifizierung an humanen 20S-Proteasomen identifiziert (Ser198, α 5-Untereinheit).

1.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Der Proteinabbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist ein streng regulierter Prozess, welcher für die Aufrechterhaltung der Zell-Homöostase essenziell ist. Substrate für das UPS stellen beschädigte, oxidierte, falsch gefaltete sowie kurzlebige regulatorische, zytosolische, nukleäre und membranständige Proteine dar (Plemper und Wolf 1999). Zum Abbau bestimmte Substrate werden über eine Ubiquitinierungskaskade kovalent mit einer Lys-gebundenen Polyubiquitin-Kette markiert und dem Adenosintriphosphat-abhängigen (ATP) Abbau durch das 26S-Proteasom zugeführt (Pickart 2004). Das 26S-Proteasom setzt sich aus dem proteolytisch aktiven 20S-Proteasom (Abb. 1-4 B) und dem 19S-regulatorischen Komplex (PA700, 19S-Regulator) (Abb. 1-4 A), welcher an einer oder beiden Seiten des Kernkomplexes binden kann, zusammen (Dahlmann 2005). Im Zuge des Abbaus von Substrat-Proteinen generiert das Proteasom 4-14mere Peptide (Nussbaum et al. 1998). Diese können entweder dem Stoffwechsel zugeführt werden, oder sie dienen als Liganden für major histocompatibility complex-class-I (MHC-Klasse-I) Rezeptoren. MHC-Klasse-I gebundene Peptide werden an die Zelloberfläche transportiert, wo sie CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL, engl. cytotoxic T-Lymphocytes) präsentiert werden. Die präsentierten Peptide (Antigene) können sowohl viralen Ursprungs sein oder fehlerhaften Proteinen (überexprimierte, mutierte oder tumorassoziierte Proteine) entstammen. Sie ermöglichen, dass die präsentierende Zelle durch CD8⁺

T-Zellen erkannt und lysiert wird. Somit nimmt das UPS eine Schlüsselrolle in der Zell-vermittelten Immunantwort ein (Kloetzel 2001; Rock *et al.* 2002).

Dysfunktionen des UPS sind mit einer Vielzahl von Krankheitsbildern wie Krebs, Neurodegeneration (Parkinson, Alzheimer), autoimmunen, metabolischen und genetischen Störungen (z.B. Muskelatrophie, Urämie) assoziiert (Lecker *et al.* 2006).



Abbildung 1-4: Proteasom-Komplexe. A) Der 19S-Regulator (PA700) bestehend aus dem *Lid*- (Deckel) und *Base*-Komplex (Basis). **B)** Der 20S-Kernkomplex, die proteolytisch aktiven β -UE sind in rot dargestellt. **C)** Der Proteasom Aktivator 28. [Abbildung entnommen aus (Strehl 2006)]

1.2.1 Konstitutive und Immuno-20S-Proteasomen

Der etwa 15 nm lange und 12 nm durchmessende 700 kDa große 20S-Kernkomplex besitzt eine zylindrische Struktur und besteht aus vier heptameren Ringen (Wolf und Hilt 2004). Die beiden äußeren Ringe setzen sich aus je sieben nichtidentischen α -Untereinheiten (UE) (α 1- α 7) und die inneren aus je sieben nichtidentischen β -UE (β 1- β 7) zusammen (Grziwa *et al.* 1991; Zwickl *et al.* 1992; Groll *et al.* 1997; Heinemeyer *et al.* 1997). Die $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ Architektur des 20S-Proteasoms führt zur Ausbildung von drei Kammern - zwei Vorkammern zwischen den α - und β -Ringen und einer katalytischen Kammer zwischen den β -Ringen (Groll *et al.* 1997). Die α -Ringe bilden zwei circa 1,3 nm durchmessende Poren aus, welche den kontrollierten Einlass entfalteter Substrat-Proteine (einzel- oder doppelsträngige poly-Peptide) über die Vorkammern in das katalytische Zentrum ermöglichen. Ohne das Binden regulatorischer Komplexe, wie dem 19S-Regulator, Proteasom Aktivator 28 (PA28) (Abb. 1-4-C) oder Proteasom Aktivator 200 (PA200) sind die Öffnungen an den Außenseiten der α -Ringe durch die N-Termini der sieben α -UE geschlossen (Groll *et al.* 1997; Groll et al. 2000). Die a3-UE nimmt hierbei eine Schlüsselrolle ein, da konservierte Reste ihres N-Terminus mit denen aller anderen α -UE interagieren (Kohler *et al.* 2001). Das Öffnen des Verschlusses wird vermutlich durch das Binden der regulatorischen Komplexe ermöglicht (Hill et al. 2002).

Das proteolytische Zentrum bilden die zwei im Inneren lokalisierten β -Ringe. Das 20S-Proteasom besitzt mindestens drei proteolytische Aktivitäten. So zeigt β 1 eine Peptidyl-Glutamyl-Peptid hydrolysierende (Caspase-ähnliche), β 2 eine Trypsin-ähnliche und β 5 eine Chymotrypsin-ähnliche Aktivität (Dahlmann *et al.* 1985). Jede dieser UE besitzt an ihrem N-Terminus einen konservierten Thr-Rest, welcher bei der Hydrolyse von Peptid-Bindungen als Nukleophil dient (Groll *et al.* 1997). Die drei proteolytisch aktiven UE werden als Vorstufen exprimiert. Dies verhindert, dass die N-terminalen Nukleophile über kotranslationale Acetylierungen inaktiviert werden und schützt die Zelle vor unkontrollierter Proteolyse. Erst nach dem Einbau dieser UE in das 20S-Proteasom werden die N-Termini autokatalytisch gespalten und so in ihre aktiven Formen überführt (Arendt und Hochstrasser 1999).

Die frühe Antwort auf eine immunologische Stresssituation (z.B. Virusinfektion) ist in den meisten eukaryontischen Zellen die Sekretion von Typ I Interferonen (INF- α und - β). Diese bewirkt die Rekrutierung von INF-y-produzierenden natürlichen Killerzellen innerhalb der ersten 24 h nach Infektion (Schroder et al. 2004; O'Connor et al. 2006). In Säugetieren kommt es daraufhin zur Transkription von drei alternativen katalytischen β -UE, den sogenannten immuno-UE (β 1i/LMP2, β2i/MECL-1 und β5i/LMP7). Die Folge ist eine de novo Synthese von misch- (m20S) und immuno-Proteasomen (i20S) anstelle von Standard-20S-Proteasomen (s20S) (Groettrup et al. 1997). Die Synthese von i20S läuft etwa viermal schneller ab als die von s20S, was eine schnelle Reaktion auf eine Infektion gewährleistet (Heink et al. 2005). Das immuno-Proteasom zeichnet sich durch veränderte Schnittpräferenzen und Substratabbau-Geschwindigkeiten aus, wodurch vermehrt antigene Peptide generiert werden (Seifert et al. 2010). INF-y stimuliert zusätzlich die Produktion von PA28, welcher vermutlich ein heptamerer Komplex ist, der sich aus drei PA28-a- und vier PA28-B-UE zusammensetzt (Rechsteiner et al. 2000). Dieser kann an einer oder beiden Seiten der α -Ringe binden und erleichtert vermutlich durch das Nach-Oben-Drücken der N-Termini der α -UE den Eintritt von Substrat-Proteinen (Whitby et al. 2000). Zusätzlich entstehen Hybrid-Proteasomen mit einer 19S-20S-PA28-Architektur (Tanahashi et al. 2000).

1.2.2 Das 26S-Proteasom

Das etwa 2,5 MDa große 26S-Proteasom setzt sich aus dem 20S-Kernkomplex und dem 19S regulatorischen Komplex, welcher an einem oder beiden α -Ringen binden kann, zusammen. Die Anlagerung des 19S-Regulators an das 20S-Proteasom ist ATP-abhängig (Ferrell *et al.* 2000). Erst

die Anlagerung von 19S ermöglicht das Binden und Abbauen polyubiquitinierter Substrate. PA700 setzt sich in mammalia aus mindestens 19 UE zusammen und wird in zwei größere Komplexe, die Basis (engl. *base*) und den Deckel (engl. *lid*), aufgeteilt (Glickman *et al.* 1998). Die Basis besteht aus sechs ATPase-UE vom AAA-Typ (engl. *ATPases associated with a variety of cellular activities*) und vier nicht ATPase-UE (Rpt1-6, engl. *regulatory particel triple A protein*; Rpn1, Rpn2, Rpn10 und Rpn13, engl. *regulatory particel non-ATPase*) zusammen (Rubin *et al.* 1998). Die ATPase-UE sind für das ATP-abhängige Öffnen der 20S-Poren verantwortlich (Rpt2) und entfalten Protein-Substrate wodurch diese in den 20S-Kernkomplex geschleust werden können (Braun *et al.* 1999; Kohler *et al.* 2001; Wolf und Hilt 2004). Der Deckel setzt sich aus mindestens neun nicht-ATPase-UE zusammen. Die Rpn-UE des Deckels und Rpt5 der Basis erkennen und binden polyubiquitinierte Substrate. Rpn11 deubiquitiniert Substrat-Proteine, wodurch die freigesetzten Ubiquitine der Zelle zugeführt werden (Verma *et al.* 2004).

1.2.3 Posttranslationale Modifizierungen an Proteasomen

Wie die meisten eukaryontischen Proteine ist das 26S-Proteasom Ziel posttranslationaler Modifizierungen. Werden 20S-Proteasomen über denaturierende zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-SDS-PAGE) aufgetrennt, würde man theoretisch maximal 17 unterschiedliche *Spots* erwarten (14 konstitutive und drei IFN-γ-induzierbare UE). Tatsächlich ist es aber möglich, bis zu 70 *Spots* in einem 2D-Gel anzufärben (Kuckelkorn *et al.* 2002). Diese Diversität ist dadurch zu erklären, dass eine UE mit unterschiedlichen Molekulargewichten und isoelektrischen Punkten (pI) vorliegen kann. Ursachen hierfür sind vermutlich proteolytische Prozessierungen, PTMs und die Bindung von Träger-Ampholyten der ersten Dimension an die Proteine.

Kimura *et al.* konnten zeigen, dass in Hefe die N-Termini von β 3, β 4, sämtlicher α -UE des 20S-Proteasomes und 12 der 19S-UE N-acetyliert vorliegen (Kimura *et al.* 2000; Kimura *et al.* 2003). Außerdem wurde eine Myristoylierung an Rpt2a nachgewiesen (Kimura *et al.* 2003). Es wird vermutet, dass die N-Acetylierungen Schutz vor proteolytischem Abbau durch zytosolisch lokalisierte Aminopeptidasen bieten, und dass die N-Myristoylierung Einfluss auf die Lokalisierung der Proteasomen innerhalb der Zelle hat (Strehl 2006).

An sämtlichen 20S-Proteasom-UE, bislang ausgenommen β 3, β 1i, β 2i und β 5i, konnten Phosphorylierungen nachgewiesen werden (Tab. 4-1 Anhang). Bose *et al.* zeigten, dass es nach INF- γ -Stimulierung zu Dephosphorylierungen an der α 7-UE (Ser243 und Ser250) kommt, was die

Dissoziation des 26S-Komplexes erleichtert und gleichzeitig die Anlagerung des unter INF- γ -Zugabe gesteigert exprimierten PA28-Regulators fördert (Bose *et al.* 2004). Durch Liu *et al.* konnte mittels Immunpräzipitation gezeigt werden, dass die Tyrosinkinasen c-Abl und Arg mit der α 4-UE interagieren, und dass die hervorgerufene Phosphorylierung an Tyr153 zur Inhibierung der proteolytischen Aktivität in 20S- und 26S-Proteasomen führt (Liu, X. *et al.* 2006). Über die Funktion der meisten Phosphorylierungen ist derzeit nichts bekannt.

Bereits 1993 wurde veröffentlicht, dass Proteasomen in der Zelle glykosyliert vorliegen können (Schmid et al. 1993). Die Daten deuteten auf Modifizierungen mit poly-Sacchariden inklusive Mannose und Sialinsäure hin. Seit dem Jahr 2003 gibt es auch Hinweise auf monomere Zucker-Modifizierungen mit β-O-gebundenem N-Acetylglukosamin. Sumegi et al. konnten über 2D-SDS-PAGE Westernblot-Analysen mit O-GlcNAc-spezifischen monoklonalen Antikörpern (MA1-072 und MA1-076) und WGA zeigen, dass in Drosophila melanogaster fünf der neunzehn 19S- (p58/Rpn3, p55/Rpn5, p48B/Rpt1, p48A/Rpt3, p42D/Rpt4 und p42C/Rpt6) und neun der vierzehn 20S-Untereinheiten ($Pros\alpha7/\alpha3$, $Pros29/\alpha4$, $Pros\alpha6/\alpha6$, $Pros28.1/\alpha7$, $Pros26/\beta1$, Pros\beta2/\beta2, Pros\beta3/\beta3, CG12000/\beta4 und Pros\beta5/\beta5) O-GlcNAc modifiziert sind (Sumegi et al. 2003). Ein Versuch, diese Glykosylierungen in Drosophila melanogaster massenspektrometrisch nachzuweisen, führte zu keinen Ergebnissen (Klement et al. 2010). Auch in Mammalia wurden inzwischen Modifizierungen mit O-GlcNAc nachgewiesen. In Westernblot-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die meisten proteasomalen Untereinheiten, die aus murinen T-Zellen Lymphom (RMA-Zelllinie) und aus Listeria monocytogenesis infizierten murinen Leber-Zellen isoliert wurden, mittels O-GlcNAc-spezifischen AK (CTD110.6 und MA1-076) und WGA nachweisbar waren. Die Spots, die mit allen Nachweismethoden detektiert werden konnten, wurden massenspektrometrisch als $\alpha 4$, $\beta 5$ und $\beta 5i$ identifiziert (Strehl 2006). Wells *et al.* war es nach Immunaufreinigung von Rattenhirn-Extrakt über einen O-GlcNAc-spezifischen AK (CTD110.6) möglich, die α6-UE massenspektrometrisch zu identifizieren (Wells et al. 2002). Im Jahr 2009 ist es der Gruppe um Gerald Hart erstmals gelungen, eine O-GlcNAc-Modifizierungsstelle an Ser198 der α 5-UE in humanen Erythrozyten zu identifizieren (Wang, Z. et al. 2009).

Ein funktioneller Zusammenhang zwischen Glykosylierung und Proteasom-Aktivität konnte für die ATPase-Aktivität von Rpt2 des 19S-Regulators gezeigt werden. Durch eine erhöhte Glykosylierung (*in vitro* und *in vivo*) wurde Rpt2 und damit der Abbau hydrophober Substrate, wie Sp1 gehemmt. Sp1 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher eine wichtige Rolle im Zuckerhaushalt der Zelle einnimmt.

Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass O-GlcNAc-Modifizierungen die proteasomale Aktivität an den metabolischen Status der Zelle anpassen (Zhang, F. *et al.* 2003).

1.3 Zielstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zum einen O-GlcNAc-Modifizierungen an 20S-Proteasomen aus unterschiedlichen murinen Geweben über immunologische und chemoenzymatische Nachweismethoden zu charakterisieren. Der Schwerpunkt lag auf der Etablierung einer Methode zum massenspektromtrischen Nachweis von monomeren β -O-gebundenem N-Acetylglukosamin an 20S-Proteasomen. Basierend auf der β -Eliminierung/Michael Additionsreaktion sollte ein neues Nukleophil entwickelt werden, dass...

- 1) eine effektive Affinitätsanreicherung substöchiometrisch O-GlcNAc-modifizierter Proteine/Peptide erlaubt.
- unter CID-Fragmentierungsbedingungen stabil ist und die Identifizierung O-GlcNAcmodifizierter Serin/Threonin-Reste ermöglicht.
- 3) über die Einführung eines strukturell identischen, Isotopen-markierten Derivatisierungsreagenz eine relative Quantifizierung zwischen zwei Proben innerhalb eines MS-Spektrums ermöglicht.

Die Etablierung der Methode sollte zunächst an glykosylierten Modell-Peptiden und an dem Standard-Protein α -Crystallin erfolgen. Anschließend sollte die Derivatisierungsstrategie auf isolierte 20S-Proteasomen aus unterschiedlichen murinen Organen angewendet werden, um qualitative Unterschiede im Glykosylierungsmuster sichtbar zu machen. Ein weiteres Ziel war der Nachweis von O-GlcNAc am Hitzeschock Protein 90.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Geräte

4700 Proteomics Analyzer MALDI TOF/TOF Elektrophorese Einheit Mighty Small SE250/SE260 Fluorimeter Fluostar Reader mit Easy Software **FPLC** Homogenisator Kühlzentrifuge RC 5C Rotor SA-300 Lyophilisationseinheit, Alpha 2-4 Mikrokonzentrator Nano-HPLC-System (Famos, Switchos, Ultimate) Opsys Platten*reader* Probot MALDI-Spot-Roboter SMART-System *Semidry*-Blot-Kammer Ultraschall Sonoplus GM70

Verbrauchsmaterialien

Einmalspritzen	Braun
Eppendorf Reagiergefäße (0,25, 0,5, 1,5, 2 ml)	Eppendorf/Sar
Mikrotiterplatten (schwarz und klar)	Greiner
Molekulargewichtsstandard, prestained	Fermentas
Nitrocellulose-Membran	LI-COR
Petrischalen	Greiner
Pipettenspitzen	Eppendorf/Sar
Reagenzglas 3,5 ml und 12 ml, PS	Sarstedt
Röngtenfilme: Xomat-UV/AR/Biomax-MR	Kodak
Polyvinylidenfluorid- (PVDF) Membran Immobolin-P	Millipore
Sterilfilter 4,5: 0,2 µm	Schleicher & S
Whatman-Papier	Schleicher & S
ZipTip/µZipTip, C18 reverse phase	Millipore

Chemikalien

Merck
Sigma
Sigma
Sigma
Roth
Promega

Applied Biosystems Hoefer SLT, Tecan Amersham, GE Healthcare Braun Sorvall Sorvall Christ Eppendorf LC Packings/Dionex Dyner Technologies LC Packings/Dionex Amersham Pharmacia BioRad Bandelin

rstedt rstedt Schuell Schuell

Ameisensäure (HPLC-grade) Ammoniumbincarbonat, reinst Ammoniumsulfat β-Mercaptoethanol **Biotin** Biotin-Cystamin-d0/d4 (BioCys-d0/d4) Serum Albumin (bovin) Chloroform Coomassie Brilliant blau R250/G250 **DEAE** Sephacel Deionisiertes Wasser, Milli Q (HPLC-Wasser) Destilliertes Wasser (dest. Wasser) Dimethylformamid (DMF) Dimethylsolfoxid (DMSO) Dinatriumhydrogenphosphat 1,4-Dithiothreitol (DTT) Dynabeads MyOneTM Streptavidin T1 Essigsäure (HPLC-grade) Ethanol. 100% Ethylendiamintetraessigsäure Extravidin-Peroxidase Fluorogene Peptidsubstrate Hydroxybenzotriazol (HOBt) Isopropanol (HPLC-grade) Kaliumchlorid Kaliumhydrogenphosphat Kalziumchlorid Methanol (HPLC-grade) Natriumazid Natriumcarbonat Natriumchlorid Natriumdesoxycholat Natriumdihydrogenphosphat Natriumhydroxid O-(2-Acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino *N*-phenyl carbamate (PugNAc) RotiblockTM Natriumdodecylsulfat (SDS) Triethylamin (TEA) Trifluoressigsäure (TFA, HPLC-grade) Tris-(2-Carboxyethyl)-phosphin Hydrochloride (TCEP) Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan Triton X 100 Tween20 Trypsin (sequence grade) Wasserstoffperoxid, 35 %

Fluka Merck AppliChem Serva Merck Dr. Henklein, Charité, Institut für Biochemie, AG Peptidsynthese Serva Merck Serva Amersham Millipore Merck Merk Carl Roth GmbH **Bio-Rad Labs** Invitrogen Merck Baker Carl Roth GmbH Sigma **Bachem Biochemica** Merck Baker Roth AppliChem Sigma Baker Merck Sigma AppliChem AppliChem Merck Carl Roth GmbH Sigma Carl Roth GmbH Sigma Sigma Fluka Carl Roth GmbH Carl Roth GmbH Carl Roth GmbH Applichem Promega Carl Roth GmbH

Kits

β-N-Acetylglukosaminidase (Jack bean) (PP0600)	Sigma
<i>ClickiTTM</i> O-GlcNAc <i>Labeling Kit</i>	Invitrogen
ECL Advanced Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare

Chromatographie-Materialen

DEAE Toyopearls 650 S (10 ml)	Tosoh Biosep GmbH
MonoQ 5/50 GL (1 ml)	GE Healthcare
PepMap C18, 3µm; 300 µm x 5 mm (Vorsäule)	LC Packings
PepMap C18, 3 μm; 75 μm x 150 mm	LC Packings
Resource 15Phe 4.6/100 PE (1,7 ml)	GE Healthcare
Superdex Peptide PC 3,3/30; 3,2 x 300 mm (2,4ml)	GE Healthcare
Superose 6B prep grade HR 10/30 (125 ml)	GE Healthcare

Antikörper

Tabelle 2-1: Liste der verwendeten Antikörper für Westernblot-Experimente.

Antikörper	Herkunft	Verdünnung
CTD110.6 anti-O-GlcNAc	Santa Cruz	1:2500
anti-a4 Proteasom	Charite, Institut für Biochemie, AG Kloetzel	1:5000
anti-Maus IgM,	Santa Cruz	1:5000
Peroxidase gekoppelt		
anti-Kaninchen IgG, Peroxidase	Dianova	1:5000
gekoppelt		

Peptide

α-O-GalNAc-Peptid
4700 Proteomics Calibration Mix (CalMix) (4333604)
Fluorogene Peptid-Substrate
Bz-Val-Gly-Arg-MCA (Trypsin)
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (Caspase)
Suc-Ala-Ala-Phe-MCA (Chymotrypsin)
Standard-Peptide

Biosynthan GmbH, Berlin Applied Biosystems Bachem Biochemica

Dr. Henklein, Charité, Institut für Biochemie, AG Peptidsynthese

Tabelle 2-2: Liste der verwendeten Standard-Peptide.

Art des Peptides	Aminosäure-Sequenz	Kurzbezeichnung	M _r in Da
Glyko-Peptide	FVFDRPLPV S(-α-O-GalNAc) R-COOH AIPV S(β-O-GlcNAc) REEKPSSAPSS-COOH	O-GalNAc-Peptid O-GlcNAc-Peptid	1534,7 1925,9
Phospho-	FVFDRPLPVpSR-COOH	pS-Peptid1	1411,7
Peptide	EAIpSAAPFAK-CONH ₂	pS-Peptid2	1082,5
	EAIpTAAPFAK-CONH ₂	pT-Peptid	1096,5
	EAIpYAAPFAK-CONH ₂	pY-Peptid	1158,5
Biotin-Peptid	Biotin-CKIGFFKRPLKKKMEK-COOH	Biotin-Peptid	2160,3

Bezeichnung	[M+H] ⁺
Des-Arg1-Bradykinin	904,4681
Angiotensin I	1296,6853
Glu1-Fibrinopeptid	1570,6774
ACTH (1-17)	2093,0870
ACTH (18-39)	2465,1989
ACTH (7-38)	3657,9294

Tabelle 2-3: Peptide und monoisotopische Massen des 4700 Proteomics Calibration Mix (CalMix).

Software

TOFTOF Series Explorer Data Explorer Version 4.6 Mascot Daemon 2.2.2 Mascot Version 2.2 Chromelion Version 6.4 *µCarrier* Version 2.0

Applied Biosystems Applied Biosystems Matrix Science Matrix Science Ltd Dionex Dionex

Internetreferenzen

http://www.expasy.org/ http://www.abrf.org/index.cfm/dm.home?AvgMass=all (Deltamass-Datenbank) http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/ (NetPhosK 1.0 Server)

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation von 20S-Proteasomen und HSP90

20S-Proteasomen wurden aus murinen Milzen, Lebern und Gehirnen, HSP90 aus murinen Lebern präpariert.

2.2.1.1 Herstellung von Organ-Homogenaten

TEAD-Lysepuffer: 20 mM Tris, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM NaN₃, 0,1 % Triton X 100, 50 mM PUGNAc in dest. Wasser pH 7,5

Die Gewebe (5-13 g) wurden im zwei- bis dreifachen Volumen gekühlten TEAD-Lysepuffer aufgenommen, in einem Dounce-Homogenisator durch 20 Stöße auf Eis aufgeschlossen und anschließend mit einer Ultraschall-Sonde behandelt. Das Homogenat wurde bei 14.000 g für 45 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und filtriert. Dem Lysepuffer wurde der O-GlcNAcase Inhibitor PUGNAc zugegeben, um unerwünschte Deglykosylierungen durch zytoplasmatische, nukleäre oder lysosomale O-GlcNAcasen zu vermeiden (Whelan and Hart 2003).

2.2.1.2 Präparation von 20S-Proteasomen und HSP90 aus Organ-Homogenaten

TEAD: 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM NaN₃ in dest. Wasser, pH 7,5 **TEAD-0.5 M NaCl:** 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM NaN₃, 0,5 M NaCl in dest. Wasser, pH 7,5 **TEAD-1.2 M (NH₄)₂SO₂:** 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM NaN₃, 1,2 M (NH₄)₂SO₄ in dest. Wasser, pH 7,5

Alle chromatographischen Schritte wurden an einer FPLC-Anlage durchgeführt. Das filtrierte Organ-Homogenat wurde auf eine in TEAD-Puffer äquilibrierte DEAE-Toyopearl-S650S Säule (Gelbettvolumen 10 ml) mit einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit zwei Säulenvolumen TEAD gewaschen. Die Elution erfolgte über einem linearen 100 ml Gradienten von 0 bis 0,5 M NaCl in TEAD (2 ml/min). Es wurden 65 1,5 ml-Fraktionen gesammelt. Anschließend wurden alle Fraktionen auf Chymotrypsin-ähnliche Aktivität (Substrat Suc-LLVY-MCA) getestet (Falkenburg et al. 1988). Die aktiven Fraktionen wurden vereint und die darin enthaltenen Proteine mittels Ammoniumsulfat gefällt. Zu diesem Zweck wurde unter ständigem Rühren auf Eis Ammoniumsulfat bis zu einer 75 %igen Sättigung zugegeben. Die präzipitierten Proteine wurden anschließend bei 30.000 g für 45 min bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in TEAD-Puffer gelöst und auf eine präparative Superose 6B Gelfiltrationssäule (Gelbettvolumen 125 ml) aufgetragen. Die Gelfiltration wurde mit einem Fluss von 0,5 ml/min TEAD-Puffer durchgeführt. Es wurden 80 Fraktionen zu je 1ml gesammelt und die proteolytisch aktiven Fraktionen vereint. Anschließend erfolgte ein weiterer Präparationsschritt über Anionenaustausch-Chromatographie an einer MonoQ 5/50 GL-Säule (Gelbettvolumen 1 ml). Nach dem Auftragen der Probe wurde die Säule mit dem zweifachen Volumen TEAD gespült. Die Elution erfolgte über einen linearen 60 ml Gradienten von 0 bis 0,5 M NaCl in TEAD (1 ml/min). Es wurden 60 Fraktionen zu je 1 ml gesammelt und die chymotryptisch aktiven Fraktionen vereint. Der letzte Reinigungsschritt erfolgte über hydrophobe Interaktionschromatographie an einer Phenyl-Superose PC1.6/5 Säule (Gelbettvolumen 1,7 ml). Zu diesem Zweck wurde die Probe bis zu einer Endkonzentration von 1,2 M mit (NH₄)₂SO₄ versetzt und anschließend auf die in 1,2 M (NH₄)₂SO₄ in TEAD äquilibrierte Phenyl-Superose-Säule aufgetragen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch einen linear absteigenden 20 ml Ammoniumsulfat-Gradienten von 1,2 M bis 0 M (NH₄)₂SO₄. Es wurden 0,5 ml Fraktionen gesammelt und die mit proteolytischer Aktivität vereint. Zusätzlich zum 20S-Pool wurden die letzten Fraktionen (0 M (NH₄)₂SO₄) aufgefangen, um das darin enthaltende HSP90 zu gewinnen. Die isolierten 20S-Proteasomen und HSP90 wurden über Nacht

gegen kaltes dest. Wasser dialysiert, um Salze quantitativ aus der Lösung zu entfernen. Die Protein-Konzentrationen wurden nach Bradford bestimmt (Bradford 1976). Die Reinheit der isolierten Komplexe wurde über 1D-SDS-PAGE-Analysen bestimmt (2.2.2).

2.2.2 Denaturierende eindimensionale-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Trenngel-Puffer (vierfach): 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,4 % (w/v) SDS in dest. Wasser **Sammelgel-Puffer (vierfach):** 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,8 % (w/v) SDS in dest. Wasser **SDS-Laufpuffer:** 25 mM Tris-HCl, 190 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3-8,5 in dest. Wasser **Acrylamid-Stammlösung:** 30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid **SDS-Proben-Puffer (einfach):** 20 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10 % (w/v) Glycerol, 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 2 % (w/v) SDS, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau in dest. Wasser

Für die Auftrennung in der 15 %igen SDS-PAGE nach Laemmli wurden die Proben in SDS-Proben-Puffer gelöst, anschließend für 5 min bei ca. 95 °C denaturiert, kurz abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen (Laemmli 1970). Zur Abschätzung der Proteingrößen wurde ein Proteinmarker (*prestained*, MG-Bereich 10 – 170 kDa) mitgeführt. Bis zum Einlaufen der Proben in das Trenngel wurden 80V, für die eigentliche Trennung 130V je nach Acrylamidanteil für 1 – 2 h angelegt. Anschließend wurden die Gele mit Coomassie *Brillant Blue* R 250 gefärbt (Scheler 1998).

Coomassie-Färbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen

Coomassie-Lösung: 0,1 g (w/v) Coomassie Brilliant blau R250, 10 % (v/v) Essigsäure, 50 % (v/v) Ethanol in dest. Wasser **Entfärber:** 10 % (v/v) Essigsäure, 45 % (v/v) Ethanol in dest. Wasser

Für den unspezifischen Nachweis von Proteinen wurden die 1D-SDS-PAGE-Gele in Coomassie-Lösung für mindestens 1 h bei RT geschwenkt. Die Coomassie gefärbten Gele wurden anschließend solange entfärbt, bis die Proteinbanden gut zu erkennen waren und der Hintergrund weitestgehend farblos war.

2.2.3 Westernblot-Analyse und Immundetektion

Transfer-Puffer: 50 mM Tris, 40 mM Glycin in dest. Wasser
TBS: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl in dest. Wasser
TBS-HT: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl, 0,3 % (v/v) Tween 20 in dest. Wasser
TBS-HD: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl, 1 % (v/v) Triton X 100; 0,1 % (w/v) SDS, 0,25 % (w/v) Natriumdesoxycholat in dest. Wasser
Blockier-Lösung: 10 % (v/v) Rotiblock in dest. Wasser
Antikörper-Lösung: AK gelöst in 10 % (v/v) Rotiblock in dest. Wasser

Die über 1D-SDS-PAGE aufgetrennten Proteine (2.2.2) wurden elektrophoretisch auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF für ClickiT) oder eine Nitrozellulose-Membran (für CTD110.6) im *Semidry*-Verfahren übertragen. Vorher wurde die PVDF-Membran in 100 % Methanol aktiviert. Die Nitozellulose-Membran wurde kurz in Transfer-Puffer äquilibriert. Die aktivierte Membran und das Gel wurden zwischen je drei Lagen in Transfer-Puffer getränktem Whatman-Papier in die *Semidry* Apparatur mit der Membran-Seite zur Anode gelegt. Der Transfer erfolgte für 40 min bei 15 Volt.

CTD110.6 Detektion O-GlcNAc-modifizierter Proteine

Für den O-GlcNAc-Nachweis wurde der murine monoklonale Anti-O-GlcNAc-AK CTD110.6 in einer Verdünnung von 1:2500 verwendet. Als sekundärer AK wurde ein Ziegen Anti-Maus IgM-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat (HRP, engl. *horseradish peroxidase*) verwendet, die Verdünnung betrug 1:5000. Überschüssige Protein-Bindungsstellen wurden mit Blockier-Lösung eine Stunde bei RT abgesättigt. Die Inkubation mit primären AK wurde für 1 h bei RT in Antikörper-Lösung durchgeführt. Anschließend wurde die Membran zweimal 10 min in TBS-HT und dreimal 10 min in TBS-HD gewaschen. Die Membran inkubierte für 1 h bei RT mit dem sekundären AK. Daraufhin wurde sie zweimal 10 min in TBS-HT und dreimal 10 min in TBS-HD gewaschen. Die gebundenen AK wurden über eine Chemilumineszenz-Reaktion detektiert.

ClickiTTM Detektion O-GlcNAc-modifizierter Proteine (Invitrogen)

Die *ClickiTTM*-Reaktion ist eine chemoenzymatische Methode zur Detektion von endständigen GlcNAc-Resten. Im ersten Schritt wird an das N-Acetylglukosamin enzymatisch ein N-Azidogalaktosamin-Rest (GalNAz) gekoppelt. Im zweiten Schritt wird durch die sogenannte *ClickiTTM*-Reaktion ein Biotin-Alkin an GalNAz gebunden. Die Azid- und die Alkin-Gruppe bilden Cu(I)-katalysiert ein stabiles Triazol Konjugat aus. Anschließend ist es möglich die so markierten Proteine im Westernblot mittels HRP-gekoppeltem Streptavidin (Verdünnung 1:5000) zu visualisieren.

Die MetOH/Chloroform-präzipitierten Proben wurden entsprechend dem Hersteller-Protokoll der *ClickiTTM*-Reaktion unterzogen.

ECL Detektion über das Enhanced Western Blotting Detection Reagents Kit

Die ECL-Lösung wurde vor der Reaktion jeweils frisch nach dem Hersteller-Protokoll angefertigt. Die Lösung wurde mit einer Pipette gleichmäßig auf der Membran verteilt und für 3 min inkubiert. Anschließend wurde überschüssiges ECL-Reagenz von der Membran entfernt. Je nach Intensität der Signale erfolgte die Exposition der Röngtenfilme für einige Sekunden bis zu mehreren Minuten.

2.2.4 Synthese des Biotin-Cystamin-d0/d4-Derivatisierungsreagenz

Die Synthese des Biotin-Cystamin-d0/d4-Derivatisierungsreagenz lief in drei Schritten ab. Im ersten Schritt wurden die freien Thiole der Cystamin-d0/d4-Bausteine über die Ausbildung von Disulfid-Brücken geschützt, anschließend erfolgte die Kondensation des Biotin-Restes und im finalen Schritt die Reduktion der Disulfid-Brücken zwischen den Cystamin-Resten um freie Thiol-Gruppen zu erhalten.

Schutz des Thiols als Disulfid

100 mg Cystamin-d0/d4 wurden in 200 ml 0,1 M NaHCO₃ in HPLC-Wasser gelöst und auf pH = 8 eingestellt. Anschließend gab man zur Reaktionslösung 2 ml 0,3 % (v/v) Wasserstoffperoxid/HPLC-Wasser und rührte 45 min bei Raumtemperatur. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde mit Ellmans Reagenz, welches freie Thiole detektiert, überprüft. Die Reaktion wurde mit 10 % (v/v) Essigsäure in HPLC-Wasser abgestoppt, die Lösung sofort eingefroren und lyophylisiert.

Umsetzung mit Biotin

Laufmittel A: 0,2 % (v/v) TFA in HPLC-Wasser **Laufmittel B:** 80 % (v/v) ACN in HPLC-Wasser

Das entstandene Disulfid (100 mg) wurde mit 3 eq. Biotin (952 mg) und 3 eq. EDC/HOBt (747,6 mg/526,5 mg) als Kondensationsreagenz umgesetzt.

Hierfür wurden EDC und das Disulfid in 5 ml HPLC-Wasser, Biotin und HOBt in 10 ml DMSO gelöst und anschließend vereint. Die Reaktion wurde bei 40 °C für 3 h gerührt. Anschließend wurde der angefallene Niederschlag abfiltriert und nochmals mit DMSO/DMF gewaschen. Die Lösung wurde lyophilisiert. Für die Reinigung wurde das Rohprodukt in 2 x 4 ml DMF aufgenommen und über eine präparative Shimadzu-HPLC-Anlage mit einem Gradienten von 15 % B auf 45 % B in 60 min gereinigt. Als Säule wurde eine Kromasil 100-10-C18, 50×250 mm verwendet.
Reduktion von Biotin-Cystamin-d0/d4

Das so erhaltene Biotin-Cystamin-Disulfid wurde in 30 % (v/v) Acetonitril/HPLC-Wasser gelöst, mit TCEP bei pH 5 reduziert und anschließend präparativ auf einer Shimadzu-Anlage mit einem Gradienten von 19 % B auf 44 % B in 50 min gereinigt. Es wurde eine Phenomenex Gemini 10 μ m C18 Säule 250×21,2 mm verwendet.

2.2.5 Methoden für das Arbeiten mit Modellpeptiden

Die Derivatisierungs- und Streptavidin-Affinitätschromatographie-Bedingungen wurden vor der Anwendung auf komplexe Proben (tryptisch verdautes, derivatisiertes α -Crystallin, HSP90 und 20S-Proteasom) an Standard-Peptiden getestet und optimiert.

2.2.5.1 β-Eliminierung/Michael Addition von glykosylierten Modell-Peptiden

BEMAD: β-Eliminierung/Michael Addition mit Dithiothreitol

BEMAD-Puffer: 10 mM DTT, 0,2 % (v/v) NaOH, 2 % (v/v) TEA in HPLC-Wasser

Die in 50 µl BEMAD-Puffer gelösten glykosylierten Standard-Peptide (je 10 pmol O-GalNAc- und O-GlcNAc-Peptid) inkubierten auf einem Thermomixer für 2 h bei 52 °C. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 5 µl 20 % (v/v) TFA/HPLC-Wasser (pH<4) gestoppt und μ *ZipTip*-entsalzt (2.2.5.3).

β-Eliminierung/Michael Addtion mit Biotin-Cystamin-d0/d4

Bio-Cys-d0-Puffer (2fach konzentriert): 10 mM Bio-Cys-d0, 0,4 % (v/v) NaOH, 4 % (v/v) TEA in HPLC-Wasser **Bio-Cys-d4-Puffer (2fach konzentriert):** 10 mM Bio-Cys-d4, 0,4 % (v/v) NaOH, 4 % (v/v) TEA in HPLC-Wasser

Die in 50 µl Biotin-Cystamin-d0/d4-Puffer gelösten glykosylierten Standard-Peptide (je 10 pmol O-GalNAc- und O-GlcNAc-Peptid) inkubierten auf einem Thermomoixer für 2 h bei 52 °C. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 5 µl 20 % (v/v) TFA/HPLC-Wasser (pH<4) gestoppt und μ *ZipTip*-entsalzt (2.2.5.3). Die Bio-Cys-d0/d4-Konzentration sollte keinesfalls höher als 10 mM gewählt werden, da höhere Konzentrationen zur Bildung von Präzipitaten neigen.

2.2.5.2 Streptavin-Affinitätschromatographie

Die selektive Anreicherung eines biotinylierten Standard-Peptides erfolgte affinitätschromatographisch an magnetischen Streptavidin-Kugeln (Dynabeads $MyOne^{TM}$

Streptavidin T1). Die Wasch- und Elutionsbedingungen wurden an dem N-terminal biotinylierten Peptid (Biotin-Peptid, Biotin-CKIGFFKRPLKKKMEK) getestet.

Vorbereiten der Dynabeads MyOneTM Streptavidin T1

Waschlösung 1: 0,1 % (w/v) BSA in 50 mM Tris-HCl in HPLC-Wasser pH 7,4

100 µl *Dynabeads MyOneTM Streptavidin T1* wurden in ein 250 µl Reaktionsgefäß gegeben. Die magnetischen *Dynabeads* wurden durch das Überführen des Reaktionsgefäßes in eine Magnethalterung an der inneren Gefäßwandung gesammelt und der Lagerungspuffer abpipettiert. Anschließend wurden die *Beads* in 200 µl Waschlösung 1 gelöst, um unspezifische Bindungsstellen des Trägermaterials abzusättigen. Nach fünfminütiger Inkubation wurde der Vorgang wiederholt.

Protokoll zur Anreicherung biotinylierter Peptide

Bindungslösung: 0,02 % (w/v) BSA, 0,2 M NaCl in Tris-HCl in HPLC-Wasser pH 7,4 **Waschlösung 1:** 0,1 % (w/v) BSA in 50 mM Tris-HCl in HPLC-Wasser pH 7,4 **Waschlösung 2:** 0,1 % (w/v) BSA, 2 M NaCl in 50 mM Tris-HCl in HPLC-Wasser pH7,4 **Waschlösung 3:** HPLC-Wasser **Waschlösung 4:** 5 % (v/v) TFA in HPLC-Wasser **Sättigungslösung:** 200 mM Biotin in HPLC-Wasser **Elutionslösung:** 70 % (v/v) ACN; 0,1 % (v/v) TFA in HPLC-Wasser

Die eingeengten biotinylierten Peptide wurden in 100 µl Bindungslösung aufgenommen und auf die vorbereiteten *Dynabeads MyOneTM Streptavidin T1* gegeben. Nach 30 minütiger Inkubation bei RT wurden 100 µl HPLC-Wasser zu dem *Dynabeads*-Peptid-Gemisch gegeben. Nach weiteren 30 Minuten wurde das Reaktionsgefäß in eine Magnethalterung überführt und der Überstand von den *Dynabeads* entfernt. Um unspezifisch gebundene Peptide vom Trägermaterial zu lösen, wurden mehrere Waschschritte durchgeführt. Zwischen jedem Waschschritt wurden die *Dynabeads* für 5 min in der jeweiligen Waschlösung belassen, anschließend wurde das Reaktionsgefäß in eine Magnethalterung überführt und 20 mal schnell innerhalb der Magenthalterung rotiert, um unspezifisch gebundene Peptide besser vom Trägermaterial zu lösen.

Die *Dynabeads* wurden zweimal in 200 µl und einmal in 100 µl Waschlösung 1, zweimal in 200 µl und einmal in 100 µl Waschlösung 2, zweimal in 200 µl und einmal in 100 µl Waschlösung 3 gewaschen. Anschließend wurden die *Dynabeads* für 15 min in 20 µl Sättigungslösung inkubiert, um alle verbliebenen Biotin-Bindungsstellen abzusättigen. Daraufhin wurden die *Dynabeads* zweimal in 50 µl Waschlösung 4 gewaschen. Die Elution der biotinylierten Peptide erfolgte durch die Zugabe

von zweimal 50 µl Elutionslösung für 10 min. Die Eluate wurden an einem Mikrokonzentrator eingeengt, in 0,1 % (v/v) TFA in HPLC-Wasser (pH<4) resuspendiert und $\mu ZipTip$ -entsalzt (2.2.5.3).

2.2.5.3 *ZipTip/µZipTip-*C18 Entsalzung

Waschlösung: 0,1 % (v/v) TFA in HPLC-Wasser Elutionslösung: 0,1 % (v/v) TFA, 60 % (v/v) ACN in HPLC-Wasser CHCA zur Direktelution mit μZipTips: 5 mg/ml CHCA in 0,1 % (v/v) TFA, 60 % (v/v) ACN in HPLC-Wasser

Um störende Salze aus der Lösung zu entfernen, wurden die Peptide vor der MALDI-MS-Analyse an einer C18-Umkerphasen-Minisäule (C18-RP engl. *C18 reversed phase chromatography*) (je nach Peptid-Konzentration *ZipTip/µZipTip*), mit einer Beladungskapazität bis zu 1 µg (μ ZipTip), bzw. 5 µg (*ZipTip*) Peptid, gereinigt. Durch dreimaliges Auf- und Abziehen von 10 µl Elutionslösung wurde das RP-Material gesäubert und anschließend durch dreimaliges Auf- und Abziehen von Waschlösung equilibriert. Das Binden der Peptide erfolgte durch zwanzigmaliges Auf- und Abziehen mit Waschlösung aus der Probe entfernt. Die Elution der Peptide erfolgte durch fünfmaliges Auf- und Abziehen mit Waschlösung aus der Probe entfernt. Die Elution der Peptide erfolgte durch fünfmaliges Auf- und Abziehen mit 0,8 µl CHCA-Lösung.

2.2.5.4 MALDI-TOF/TOF MS und MSMS

Die MALDI-TOF/TOF MS und MSMS-Messungen wurden an einem 4700 *Proteomics Analyser* MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer, ausgestattet mit einem Nd: YAG Laser (355 nm), durchgeführt. Die MS- und MSMS-Spektren wurden im positiven Reflektor-Modus des Massenspektrometers aufgenommen. MS-Spektren wurden in einem Massenbereich *m/z* 800 bis 4000 aufgenommen und durch die Akkumulation von 1000 (für die relative Quantifizierung 2000) aufeinander folgenden Laserschüssen von verschiedenen Positionen eines Messpunktes erhalten. Die Spektren wurden mittels *default* Kalibrierung prozessiert. Diese wurde vor der Messung mit dem 4700 *Proteomics Calibration Mix* (CalMix) (Tabelle 2-3) auf 6 Kalibrierungspunkten aktualisiert.

Die MSMS-Spektren wurden mit folgenden Stop-Kriterien aufgenommen: Es wurden nur *Precursor* zur Fragmentierung herangezogen, die im MS ein Signal/Rausch-Verhältnis > 30 aufzeigten. Für jedes Subspektrum wurden 250 Laserschüsse akkumuliert und die Messung wurde gestoppt, sobald

20 Subspektren akzeptiert wurden. Die *Precursor*-Auswahl für die Standard-Peptide erfolgte zum Teil manuell.

2.2.6 Methoden für das Arbeiten mit Proteinen

2.2.6.1 Methanol/Chloroform-Präzipitation

Die in destilliertem Wasser gelösten Proteine sollten vor der In-Atmosphäre Oxidation (2.2.6.2) als trockenes Pellet vorliegen. Zu diesem Zweck wurden die Proben Methanol/Chloroform präzipitiert (mindestens 10 μg α-Crystallin, 100 μg HSP90 und 300 μg 20S-Proteasom). Zu 200 μl Probe wurden 500 μl Methanol, 150 μl Chloroform und 400 μl HPLC-Wasser nacheinander in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Zwischen jedem dieser Schritte wurde die Lösung kurz geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung bei 14.000 g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Es bildeten sich eine obere, eine untere und eine Interphase aus, in Letzterer befanden sich die präzipitierten Proteine. Die obere Phase wurde quantitativ abpipettiert. Zu der restlichen Lösung wurden 450 μl Methanol gegeben und das Gemisch erneut für 5 min bei 14.000 g und 4 °C zentrifugiert. Die Proteine bildeten ein Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde anschließend für 30 min bei RT luftgetrocknet.

2.2.6.2 In-Atmosphäre Oxidation

Da alkylierte/nichtalkylierte Cys- und Met-Reste der β -Eliminierung/Michael Additionsreaktion unterliegen, schlägt die Literatur vor, diese vor der Derivatisierung zu oxidieren. Dies kann In-Lösung (Ball *et al.* 2006) oder In-Atmosphäre (Vosseller *et al.* 2005) mit Perameisensäure erfolgen. Die In-Atmosphäre-Oxidation ist dabei die weitaus schonendere Methode, weshalb alle Oxidationen in dieser Arbeit In-Atmosphäre durchgeführt wurden. Neben Cys- und Met- bilden auch His- und Trp-Reste Oxidationsprodukte, die bei der Datenbank-Analyse berücksichtigt wurden (Tab. 2-5)

Perameisensäure: 5 % (v/v) 30 % igen H₂O₂, 95 % (v/v) 85 % ige Ameisensäure

Perameisensäure wurde durch Mischen von 5 % (v/v) 30 % igen Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und 95 % (v/v) 85 % iger Ameisensäure, und anschließende einstündige Inkubation bei RT hergestellt. Ein Milliliter Perameisensäure wurde in eine Petrischale gegeben und auf den Boden eines Exsikkators gestellt. Das am Mikrokonzentrator eingeengte, in einem offenen 1,5 ml Reaktionsgefäß vorliegende Protein-Pellet wurde darüber platziert und der Exsikkator evakuiert. Nach zweistündiger Inkubation in Perameisensäure-Atmosphäre, wurde die Probe aus dem Exsikkator entfernt und für

30 min in einen Mikrokonzentrator evakuiert, um alle Perameisensäure-Dämpfe aus dem Reaktionsgefäß zu entfernen.

2.2.6.3 Tryptischer In-Lösung-Verdau

Verdau-Puffer: 5 % (v/v) ACN in 50 mM ABC in HPLC-Wasser **Trypsin-Stammlösung:** 0,1 µg/µl lyophilisiertes Trypsin, 50 mM Essigsäure in HPLC-Wasser

Für den massenspektrometrischen O-GlcNAc-Nachweis wurden bovines α-Crystallin, HSP90 (Mausleber) und 20S-Proteasomen (Mausmilz und –gehirn) verwendet.

Die eingeengten oxidierten Proteine wurden vor dem tryptischen Verdau in 100 μ l Verdau-Puffer gelöst. Anschließend wurde Trypsin im Substrat/Enzym Verhältnis von 100:1 (w/w) zu den gelösten Proteinen gegeben. Die Proben wurden 16 bis 18 h bei 37 °C verdaut. Der Verdau wurde durch die Zugabe von 10 μ l 20 % (v/v) TFA in HPLC-Wasser gestoppt und die Probe im Mikrokonzentrator eingeengt. Die Probe löste sich nach der Oxidation sehr schlecht, erst durch die Inkubation mit Trypsin verschwanden die Präzipitate vollständig.

2.2.6.4 Dephosphorylierung und Deglykosylierung

OGA-Puffer (einfach): 20 mM Natriumcitrat in HPLC-Wasser, pH 6 bei 37 °C **SAP-Puffer (einfach):** 50 mM Tris-HCl, 0,5 mM MgCl₂ in HPLC-Wasser, pH 9 bei 37 °C

Die eingeengten tryptischen Peptide wurden in 20 µl OGA-Puffer gelöst und 10 min bei 99 °C auf einem Thermoschüttler inkubiert. Dieser Schritt diente der Inaktivierung des Trypsins. Anschließend wurden der Probe 20 pmol in HPLC-Wasser (AIPVS(βgelöstes O-GlcNAc-**O-GlcNAc**)REEKPSSAPSS) und 80 pmol O-GalNAc-Peptid (FVFDRPLPVS(α-O-GalNAc)R) zudotiert. Die Probe wurde daraufhin im Verhältnis 1:1 (je 10 µl) auf zwei neue 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Eine Probe wurde für 16 h mit 0,1 U (10 μl) β-N-Acetylglukosaminidase (OGA) und anschließend erneut für 3 h mit 0,1 U (10 µl) OGA inkubiert. Der anderen Probe wurde das gleiche Volumen (20 µl) OGA-Puffer zugegeben. Die Dephosphorylierung erfolgte in beiden Proben durch die Zugabe von 5 U alkalischer Schrimpsphosphatase (SAP) für 3 h bei 37 °C. Die Konzentration des SAP-Puffers wurde so gewählt, dass sie im Endvolumen von 90 µl einfach war (SAP-Pufferstammlösung 10fach konzentriert).

2.2.6.5 β-Eliminierung/Michael Addition mit Bio-Cys-d0/d4

Bio-Cys-d0-Puffer (zweifach konz.): 10 mM Bio-Cys-d0, 0,4 % (v/v) NaOH, 4 % (v/v) TEA in HPLC-Wasser **Bio-Cys-d4-Puffer (zweifach konz.):** 10 mM Bio-Cys-d4, 0,4 % (v/v) NaOH, 4 % (v/v) TEA in HPLC-Wasser

Zu den +/- OGA, +/+ SAP behandelten in 90 µl gelösten Proben wurden je 90 µl 2fach konzentrierter Bio-Cys-d0- (- OGA) bzw. Bio-Cys-d4-Lösung (+ OGA) zupipettiert (pH 11-12). Die Proben inkubierten für 2 h bei 52 °C auf einem Thermoschüttler. Jeweils gleiche Volumina der Proben wurden vereint und mit 20 % (v/v) TFA in HPLC-Wasser auf einen neutralen pH-Wert eingestellt. Der Wert wurde durch den Farbumschlag auf pH-Papier bestimmt.

2.2.6.6 Größenausschluss-Chromatographie über Superdex Peptide PC3.2/30

Laufmittel: HPLC-Wasser

Um das im großen Überschuss zugesetzte Bio-Cys-d0/d4 vor der Streptavidin-Affinitätsanreicherung von den Peptiden zu trennen, wurden die vereinten Proben über Gößenausschluss-Chromatographie auf einer *Superdex Peptide* PC3.2/30 separiert. Der optimale Trennbereich dieser Gelfiltrationssäule liegt zwischen 100 und 7000 Da. Sie eignet sich demnach sehr gut um Peptide, die im Messbereich m/z 800 – 4000 im MALDI-TOF/TOF MS detektiert werden von Bio-Cys-d0/d4 (303 Da und 307 Da) und ihren über Disulfid-Brücken verknüpften Dimere (604 Da, 608 Da und 612 Da) abzutrennen.

Die Trennung erfolgte an einem SMART-FPLC-System. Es wurden jeweils 50 µl Probe mit einem Fluß von 60 µl/min auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte in 3 ml HPLC Wasser bei einem Fluß von 60 µl/min. Es wurden 60 Fraktionen zu je 50 µl aufgefangen. Unabhängig vom untersuchten Protein eluierten die Peptide jeweils in den Fraktionen 18 bis 39 gefolgt von den Bio-Cys-d0/d4-Fraktionen 42 bis 52. Die Peptid- und Biotin-Fraktionen wurden jeweils vereint. Um die Güte der Trennung zu überprüfen wurden jeweils 4 % des Peptid- und Bio-Cys-d0/d4-Pools massenspektrometrisch untersucht. Die Peptidfraktionen aller Gelfiltrationsläufe wurden anschließend vereint und lyophilisiert.

2.2.6.7 Streptavidin-Affinitätschromatographie tryptischer Bio-Cys-d0/d4-Derivate

Nach der Gelfiltration erfolgte die Streptavidin-Affinitätsanreicherung Bio-Cys-d0/d4-derivatisierter Peptide wie unter 2.2.5.2 beschrieben. Die in 70 % (v/v) ACN; 0,1 % (v/v) TFA/HPLC-Wasser

eluierten Peptide wurden komplett eingeengt und anschließend in 12 μ l 0,1 % (v/v) TFA/HPLC-Wasser gelöst. 2 μ l der Lösung wurden direkt μ *ZipTip* entsalzt (2.2.5.3) und auf eine MALDI-Platte aufgetragen. Die restlichen 10 μ l wurden über LC-MALDI-TOF/TOF MSMS analysiert.

2.2.6.8 Nano-HPLC-MALDI-TOF/TOF MS und MSMS

Nano-HPLC

Laufmittel A: 2 % (v/v) ACN; 0,05 % (v/v) TFA in HPLC-Wasser Laufmittel B: 80 % (v/v) ACN; 0,045 % (v/v) TFA in HPLC-Wasser CHCA-nano-HPLC: 5 mg/ml α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure 0,1 % (v/v) TFA, 70 % (v/v) ACN in HPLC-Wasser

Die über Affinitätschromatographie angereicherten, *ZipTip*-entsalzten, in 10 μ l 0,1 % (v/v) TFA/HPLC-Wasser gelösten Peptide, wurden über RP-Chromatographie an einer Ultimate Nano-HPLC, die an einen Probot Fraktionsroboter gekoppelt war, separiert. 10 μ l Probe wurden auf einer PepMap C18, 3 μ m 300 μ m x 5 mm Vorsäule aufkonzentriert und einer PepMap C18 3 μ m 75 μ m x 150 mm analytischen Säule getrennt. Die Flussrate betrug 200 nL/min.

Die Elution der tryptischen Peptide des α -Crystallins erfolgte über den binären Gradienten: 0-15 % B in 4 min, 15-60 % B in 40 min, 60-100 % B in 5 min.

Für die HSP90 Peptide war der Gradient: 0-15 % B in 4 min, 15-60 % in 60 min, 60-100 % B in 5 min.

Für die proteasomalen Peptide war der Gradient: 0-15 % B in 4 min, 15-60 % in 100 min, 60-100 % B in 5 min.

Der Säulenfluss wurde kontinuierlich mit MALDI-Matrix (CHCA-nano-HPLC) mit einer Flussrate von 1 μ l/min gemischt und in 10 Sekunden Intervallen auf eine MALDI-Platte aufgetragen. Beim α -Crystallin wurde ein Separationslauf auf 26 x 8, bei HSP90 26 x 12 und bei 20S-Proteasom auf 26 x 24 Messpunkte verteilt.

MALDI-TOF/TOF MS und MSMS von tryptischen Bio-Cys-d0/d4-derivatisierten Peptiden

Die MS-Spektren wurden in einem Massenbereich *m/z* 700 bis 4000 aufgenommen und durch die Akkumulation von 2000 aufeinander folgenden Laserschüssen (von verschiedenen Positionen) eines Probenspots erhalten und mittels *default* Kalibrierung prozessiert. Die interne Kalibrierung der Spektren erfolgte mit dem 4700 *Proteomics Calibration Mix* (CalMix) (Tabelle 2-3) auf 6 Kalibrierungspunkten.

Die MSMS-Spektren wurden mit den unter Punkt 2.2.5.4 beschriebenen Stop-Kriterien aufgenommen. Bekannte Kontaminationsmassen, wie Matrixpeaks (m/z 700-1199 +/- 0,2; m/z 1200-1300 +/- 0,15) und Natrium-Addukte wurden anhand einer Ausschluss-Liste nicht zur Fragmentierung herangezogen. Die Mess-*Software* wurde so eingestellt, dass um 4 Da schwerere *Precursor*massen nicht fragmentiert wurden, da es sich dabei um die mit deuteriertem Bio-Cys-d4 markierten Peptide gehandelt hätte, deren um 4 Da leichtere *Precursor* bereits fragmentiert wurden.

Analyse der LC-MALDI-TOF/TOF MSMS-Daten

Die automatische Analyse der MSMS-Daten erfolgte mit der Mascot *Daemon* (Version 2.2.2) *Software* mit Hilfe des Mascot-Algorithmus (Version 2.2). Die verwendeten Suchkriterien für die Identifizierung der α -Crystallin-, HSP90- und 20S-Proteasom-Peptide sind in Tabelle 2-4 dargestellt.

Tabelle 2-4: Einstellungen der Datenbankanalyse. Darstellung der verwendeten Suchkriterien zur Identifizierung tryptischer α -Crystallin-, HSP90- und 20S-Proteasom-Peptide für den Mascot-Algorythmus Version 2.2 mit Trypsin und ohne Protease.

Suchkategorien	Analyse mit Trypsin	Analyse ohne Enzym
Taxonomy	all entries	mammalia
Database	NCBI	Sprot
Enzyme	Trypsin/P	none
Precursor Tolerance	100 ppm	100 ppm
MSMS Tolerance	0,2 Da	0,2 Da
Peptide charges	1+	1+
Max missed cleavages	2	0
Variable	Bio-Cys-d0 (S,T), Bio-Cys-d0 (C), Bio-Cys-d4 (S,T), Bio-Cys-d4 (C), Deamidierung (N,Q),	
Modifications	Pyro-glu (N-term), Perfomic_Ox_1x_(WCMH), Perfomic_Ox_2x_(WCMH),	
	Perfomic_Ox_3x_ (WC), Performic_Ox_Cl_ (Y), N-Acetyl (Protein)	

Die Massen des Parameters "*Variable Modifications*", die dem Mascot *mod_file* im Rahmen der Promotion hinzugefügt wurden, sind in Tabelle 2-5 zusammengefasst.

Tabelle 2-5: Liste der variablen Modifizierungen. Aufgelistet sind die monoisotopischen und *average*-Massen, welche der Mascot-Modifizierungsdatei (*mod_file*) hinzugefügt wurden.

		Masse	
Bezeichnung der Modifizierung im mod_file	Modifizierte	Monoisotopisch	Average
	Aminosäure		
Bio-Cys-d0 (ST)	Ser	372,1441	372,521
	Thr	386,1597	386,548
Bio-Cys-d0 (C)	Cys	372,1441	372,521
Bio-Cys-d4 (ST)	Ser	376,1441	376,521
	Thr	390,1597	390,548
Bio-Cys-d4 (C)	Cys	376,1441	376,521

Performic_Ox_1x_(WCMH)	Trp	202,0742	202,213
	Cys	119,0041	119,145
	Met	147,0354	147,198
	His	153,0538	153,141
Performic_Ox_2x_(WCMH)	Trp	218,0691	218,212
	Cys	134,9801	135,144
	Met	163,0303	163,197
	His	169,0487	169,14
Performic_Ox_3x_(WC)	Trp	234,064	234,211
	Cys	150,9939	151,143
Performic_Ox_Cl_(Y)	Tyr	197,0243	197,620

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Charakterisierung von O-GlcNAc-Modifizierungen an 20S-Proteasomen über Westernblot-Experimente

Den ersten Schritt zur Charakterisierung O-GlcNAc-modifizierter Proteine stellt im Allgemeinen der immunologische Nachweis der Zucker-Modifizierung mit O-GlcNAc-spezifischen Antikörpern dar. Der, aufgrund seiner breiten Spezifität am häufigsten verwendete monoklonale AK ist CTD110.6 (Comer *et al.* 2001). Neben diesem wurde in der vorliegenden Arbeit *ClickiTTM*, eine chemoenzymatische Markierungsmethode zum O-GlcNAc-Nachweis, angewendet. Über die *ClickiTTM*-Methode werden endständige N-Acetylglukosamin-Reste biotinyliert. Die so markierten O-GlcNAc-modifizierten Proteine können anschließend im Westernblot über Streptavidingekoppelte Peroxidase visualisiert werden (Abb. 3-1).



Abbildung 3-1: Prinzip der chemoenzymatischen *ClickiTTM*-Methode. A) Im ersten Schritt der *ClickiTTM*-Reaktion wird ein UDP-N-Azidogalaktosamin katalytisch durch eine Galaktosyltransferase-Mutante an endständige GlcNAc-Reste angelagert. B) Im zweiten Schritt erfolgt die Cu(I)-katalysierte Anlagerung von Biotin-Alkin. Die Azid-Gruppe des GalNAz und das Alkin des Biotin-Restes bilden hierbei ein stabiles Triazol aus.

Mithilfe dieser Nachweis-Methoden sollten im Vorfeld der angestrebten massenspektrometrischen O-GlcNAc-Identifizierung zwei Fragen beantworten werden.

- 1) Zeigen 20S-Proteasomen, die aus verschiedenen murinen Geweben isoliert wurden, qualitative und quantitative Unterschiede bezüglich ihrer O-GlcNAc-Modifizierungen?
- Ist es möglich, 20S-Proteasomen auf Protein-Ebene enzymatisch oder chemisch zu deglykosylieren?

3.1.1 Detektion von O-GlcNAc-Modifizierungen an murinen Leber-, Milz- und Gehirn-20S-Proteasomen und HSP90

Im Vorfeld der massenspektrometrischen Identifizierung von O-GlcNAc-Modifizierungen sollten die aus murinen Lebern, Milzen und Gehirnen isolierten 20S-Proteasomen in Westernblot-Experimenten mit dem O-GlcNAc-spezifischen AK CTD110.6 hinsichtlich ihres O-GlcNAc-Status verglichen werden. Die verwendeten Gewebe wurden aus folgenden Gründen gewählt: Es ist bekannt, dass im Gehirn hohe Konzentrationen der O-GlcNAc-Transferase vorliegen und aus diesem Grund die Wahrscheinlichkeit besteht, dass 20S-Proteasomen in diesem Gewebe stärker glykosyliert werden als in anderen Geweben (Kreppel et al. 1997). Eine höhere O-GlcNAc-Stöchiometrie würde die Voraussetzungen für den angestrebten massenspektrometrischen Nachweis der Zucker-Modifizierungen an 20S-Proteasomen verbessern. Um die vermutete höhere Abundanz der O-GlcNAc-Modifizierung an Gehirn-20S-Proteasomen im Westernblot vergleichend untersuchen zu können, wurden zusätzlich 20S-Proteasomen aus den Lebern derselben Tiere isoliert. Ein Ziel dieser Arbeit war, Unterschiede im qualitativen O-GlcNAc-Status zwischen konstitutiven 20S-Proteasomen und immuno-20S-Proteasomen zu analysieren. In lymphatischen Organen wie der Milz liegen immuno-20S-Proteasomen in hoher Abundanz vor (60%), während in Gehirn und Leber hauptsächlich konstitutive 20S-Proteasomen gebildet werden (Noda et al. 2000). Für den angestrebten Vergleich wurden 20S-Proteasomen aus murinen Milzen isoliert.

Die hier verwendeten 20S-Proteasomen wurden in Gegenwart des O-GlcNAcase-Inhibitors PUGNAc aufgereinigt. Dies sollte Deglykosylierungen während der Organ-Homogenisierung vermeiden. PUGNAc ist hierfür aufgrund seiner breiten Substrat-Spezifität besonders geeignet. Neben der zytoplasmatisch und nukleär lokalisierten OGA bewirkt PUGNAc zusätzlich die Inhibition einer Vielzahl lysosomaler Hexosaminidasen (Macauley und Vocadlo 2009). Zusätzlich zu 20S-Proteasomen wurde aus muriner Leber isoliertes Hitzeschock Protein 90 (HSP90, engl. *heat shock protein 90*) mit CTD110.6 angefärbt (Abb. 3-2).

Die 20S-Proteasomen und HSP90 wurden über denaturierende eindimensionale SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet und mit CTD110.6 inkubiert. In einer Probe wurde der O-GlcNAc-AK vor der Inkubation der Blot-Membran mit 0,5 M freien GlcNAc abgesättigt. Dies diente als Spezifitätskontrolle, um auszuschließen, dass es sich bei den detektierten Signalen um unspezifisch angefärbte Protein-Banden handelte. Die Inkubation mit freiem GlcNAc führte zu einer fast vollständigen Auslöschung der Westernblot-Signale (Abb. 3-2, CTD110.6 +

GlcNAc). Die über CTD110.6 generierten Banden-Muster der unterschiedlichen 20S-Proteasomen ähneln sich stark. Die unterschiedlich intensiven Färbungen sind vermutlich auf nicht gleichmäßige Gelbeladungen zurückzuführen. Dies zeigt sich sowohl anhand der Coomassie-Färbung als auch der α 4-Ladekontrolle. Über eine massenspektrometrische Peptidmassen-Fingerabdruck-Analyse (PMF, engl. *peptide mass fingerprint*) konnten den einzelnen CTD110.6-detektierten Banden 20Sproteasomale UE zugeordnet werden (Abb. 3-2, 1*-7*). Die Korrelation der Westernblot- und PMF-Daten ergab, dass alle α - und β -UE, ausgenommen β 1, β 3 und β 4 potentiell O-GlcNAc-modifiziert werden. Für die in Milz-20S-Proteasomen inkorporierten katalytischen immuno-UE β 1i, β 2i und β 5i lassen sich keine Aussagen treffen, da die PMF-Analyse an konstitutiven 20S-Proteasomen erfolgte.



Abbildung 3-2: Qualitativer und quantitativer Vergleich von O-GlcNAc-Modifizierungen an murinen Leber-, Milz- und Gehirn-20S-Proteasomen und Leber-HSP90 über CTD110.6. Es wurden jeweils die angegebenen Mengen Protein über 15 % ige SDS-PAGE aufgetrennt und im *semidry*-Verfahren auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Als Spezifitätskontrolle wurde CTD110.6 einmal in 0,5 M GlcNAc für zehn Minuten bei 4 °C vorinkubiert, um freie Zuckerbindungsstellen abzusättigen. Als Ladekontrollen dienen das Coomassie-gefärbte Gel und ein AK gegen die proteasomale α 4-UE. Die Zuordnung der 20S-UE erfolgte über eine massenspektrometrische PMF-Analyse.

Wie die massenspektrometrische Zuordnung der Banden zeigt, kann über 1D-SDS-PAGE keine vollständige Separation in einzelne UE erreicht werden. Um eine Trennung der einzelnen UE zu erzielen, wären 2D-SDS-PAGE-Experimente nötig gewesen. Hier werden Proteine in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) und erst in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dies ermöglicht die Separation von Proteinen mit ähnlichen Massen aber unterschiedlichen pIs. Über Westernblot-Experimente wäre es somit möglich, den Kreis der potentiell O-GlcNAc-modifizierten 20S-UE weiter einzuengen. Im Rahmen der Arbeit wurden 2D-SDS-PAGE-Westernblot-Experimente an isolierten 20S-Proteasomen durchgeführt, welche aber wegen der geringen Protein-Konzentrationen aus einer Proteasom-Präparation zu keinen auswertbaren Ergebnissen führten. Aufgrund der panspezifischen Eigenschaften von CTD110.6

könnte zudem lediglich festgestellt werden, dass eine bestimmte UE O-GlcNAc-modifiziert ist, aber nicht, ob eine nicht-detektierte UE nicht glykosyliert ist. Um quantitative Vergleiche bezüglich des Glykosylierungsstatus unterschiedlicher 20S-Proteasomen anzustellen, wären aufwendige Versuchsanordnungen nötig. Eine Möglichkeit wäre, die O-GlcNAc-Reste der isolierten Komplexe chemoenzymatisch mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen zu markieren, die derivatisierten Proben zu vereinen und die einzelnen UE über 2D-SDS-PAGE aufzutrennen. Dies würde einen direkten Vergleich zwischen mehreren Proben innerhalb eines Gels ermöglichen. Eine Aussage über die relative Abundanz einer bestimmten O-GlcNAc-Modifizierung könnte aber weiterhin nicht getroffen werden, da sich die Intensität des Fluoreszenz-Signals aus der Summe der O-GlcNAc-Modifizierungen an einer UE zusammensetzt. Beispielsweise könnte eine hochabundante Glykosylierung der α 6-UE in Leber-20S-Proteasomen ein ähnlich starkes Signal erzeugen, wie drei niedrigabundante O-GlcNAc-Modifizierungen in Gehirn-20S-Proteasomen. Im Gegensatz zu Phosphorylierungen, welche eine Verschiebung in den sauren Bereich während der isoelektrischen Fokussierung bewirken, führen eine oder mehrere O-GlcNAc-Modifizierungen weder zu einem veränderten isoelektrischen Punkt und damit zu einer Verschiebung in der ersten Dimension noch zu einem ausreichenden Massen-Unterschied (M_r GlcNAc = 221 Da), um eine Trennung in der zweiten Dimension hervorzurufen.

HSP90 war nicht über CTD110.6 detektierbar (Abb. 3-2, Spur 1). Dies steht im Widerspruch zu publizierten Daten. Wells *et al.* konnten HSP90 aus Rattenhirn-Extrakt über CTD110.6 präzipitieren (Wells *et al.* 2002). Ob es sich hierbei um die konstitutiv exprimierte Isoform HSP90 β oder die unter Stress gebildete Isoform HSP90 α handelte, wurde nicht erwähnt. In einer kürzlich erschienenen Publikation konnte aus humanen Erythrozyten immun-präzipitiertes HSP90 α über CTD110.6 angefärbt werden (Wang, Z. *et al.* 2009). Es ist wahrscheinlich, dass HSP90 α nur niedrigabundant in den murinen Leber-Präparationen vorlag und aus diesem Grund nicht über CTD110.6 nachweisbar war. Außerdem könnten Spezies- oder Gewebe-Unterschiede und damit verbundene veränderte PTM-Muster zwischen humanen und murinen HSP90 dafür verantwortlich sein, dass eine Detektion über CTD110.6 nicht möglich war. Der benutzte O-GlcNAc-AK erkennt nicht jede mono-Glykosylierung. Beispielsweise war es nicht möglich, die O-GlcNAc-Modifizierungen an α -Crystallin unabhängig von der eingesetzten Protein-Konzentration (> 5 µg) nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). Die Beobachtung, dass murines HSP90 nicht über CTD110.6 detektierbar ist, kann

demnach viele Ursachen haben, und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass HSP90 O-GlcNAcmodifiziert ist.

Zusammenfassend lässt sich folgendes festhalten: Die aus murinen Lebern, Milzen und Gehirnen isolierten 20S-Proteasomen zeigten nach der Inkubation mit dem O-GlcNAc-spezifischen AK CTD110.6 ähnliche Banden-Muster. Die vermutete höhere O-GlcNAc-Stöchiometrie an Gehirn-20S-Proteasomen konnte nicht beobachtet werden. Die PMF-Analyse der kongruenten SDS-PAGE-Banden ergab, dass alle proteasomalen UE ausgenommen β 1, β 3 und β 4 potentiell O-GlcNAc-modifiziert sind. HSP90 konnte nicht über CTD110.6 detektiert werden.

3.1.2 Versuche zur enzymatischen und chemischen Deglykosylierung von 20S-Proteasomen

Um O-GlcNAc-Modifizierungen über die im nächsten Kapitel vorgestellte Massenspektrometriebasierte Methode nachzuweisen, ist es nötig, einen Teil der Probe effektiv zu deglykosylieren. Es ist bekannt, dass die Hydrolyse β -O-glykosidischer Bindungen an intakten Proteinen mit lysosomalen β -N-Acetylglukosaminidasen (O-GlcNAcasen, OGA) häufig sehr ineffektiv verläuft, vor allem, wenn es sich um Proteine handelt, die komplexe tertiäre und quartiäre Strukturen ausbilden. Aufgrund sterischer Hinderungen ist es lysosomalen O-GlcNAcasen in solchen Fällen oft nicht möglich an den Ort der Hydrolyse zu gelangen.

Für die Deglykosylierungsversuche und die anschließende Detektion über den O-GlcNAcspezifischen AK CTD110.6 oder der *ClickiTTM*-Methode wurden 20S-Proteasomen aus humanen Erythrozyten und murinen Lebern verwendet. Um die Zugänglichkeit der O-GlcNAc-modifizierten AS zu erhöhen, wird in der Literatur die Verwendung von Detergenzien (SDS, Triton X 100) während der Deglykosylierung vorgeschlagen (Whelan und Hart 2006). Diesen Protokollen folgend, wurden zweifach konzentrierte Lösungen mit unterschiedlichen Detergenz-Zusätzen hergestellt, die 20S-Proteasomen darin für 5 min bei 95 °C denaturiert, anschließend im gleichen Volumen Deglykosylierungspuffer gelöst und für 16 h mit 0,2 U OGA verdaut (Abb. 3-3 A).

Die Verwendung von 0,5 % (w/v) SDS im Verdau-Puffer zeigte die stärkste Reduktion des CTD110.6-Signals im Vergleich zu den Kontrollen ohne OGA. Die korrespondierende Coomassiegefärbte Spur zeigte aber ebenfalls eine im Vergleich zu den anderen Spuren schwächere Färbung. Eine vollständige Deglykosylierung konnte mit der eingesetzten OGA-Menge nicht beobachtet werden. Im Folge-Experiment wurden aus diesem Grund die OGA-Konzentrationen variiert (Abb. 3-3 B). Trotz identischer Deglykosylierungsbedingungen wie im Vorversuch, führte die

Behandlung mit 0,2 U OGA zu keiner Signal-Reduktion. Lediglich in der Probe, welche mit einem Unit OGA inkubiert wurde, war eine deutliche O-GlcNAc-Abnahme im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten.



je Spur 3 µg 20S-Proteasom, human Erythrozyten

Abbildung 3-3: Enzymatische Deglykosylierung humaner Erythrozyten 20S-Proteasomen und anschließender O-GlcNac-Nachweis über CTD110.6. Repräsentative Westernblots gegen O-GlcNAc vor und nach enzymatischer Deglykosylierung. Je Spur wurden 3 μ g aufgereinigte 20S-Proteasomen aufgetragen. A) Vor der enzymatischen Deglykosylierung mit 0,2 U OGA für 16 h bei 37°C wurden die Proben in den angegebenen zweifach konzentrierten Detergenz-Lösungen für 5 min bei 95 °C denaturiert, anschließend in OGA-Verdau-Puffer aufgenommen und deglykosyliert. Die so behandelten Proben wurden über 15 %ige SDS-PAGE aufgetrennt und im *semidry*-Verfahren auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Die Coomassie-gefärbten Gele dienen als Ladekontrolle. B) Die 20S-Proteasomen wurden in der Detergenz-Lösung, welche den stärksten Effekt bewirkte, denaturiert und anschließend mit den angegebenen OGA-Konzentrationen deglykosyliert. Die 2 x 0,2 U-Probe wurde 1 x für acht Stunden mit 0,2 U OGA für acht h deglykosyliert.

Der gleiche Versuch wurde mit der *ClickiTTM*-Methode durchgeführt (Abb. 3-4 A). Die chemoenzymatische Markierung führte zu einem völlig veränderten Banden-Muster. Während im CTD110.6-Experiment nur drei distinkte Banden wurden. detektiert war nach der chemoenzymatischen Markierung praktisch das gesamte 20S-Proteasom-Muster nachweisbar. Dass es sich um eine unspezifische Reaktion der Streptavidin-Peroxidase handelte, konnte durch die underivatisierte Kontrolle in Spur 6 (Abb. 3-4 A) ausgeschlossen werden. Spezies-Unterschiede sind ebenfalls nicht für das veränderte Banden-Muster verantwortlich, da im Rahmen der Arbeit auch *ClickiTTM*-Blots mit humanen Erythrozyten-20S-Proteasomen angefertigt wurden, die identische Signale zeigten (Daten nicht gezeigt). Vielmehr sind die Gründe wohl in der höheren Sensitivität der *ClickiTTM*-Methodik und der panspezifischen Natur des CTD110.6-AK zu suchen. CTD110.6

erkennt zwar bislang das breiteste Spektrum an O-GlcNAc-Modifizierungen, aber neben dem Ser/Thr-gebundenen O-GlcNAc-Rest benötigt er zusätzlich eine bestimmte Peptid-Umgebung, um an Proteine zu binden. Die Deglykosylierung mit 0,2 U OGA zeigte im *ClickiTTM*-Experiment keinerlei Reduktion des Signals im Vergleich zur unbehandelten Probe (Abb. 3-4 A, Spuren 1 und 2).







Abbildung 3-4: Chemische und enzymatische mono-O- und poly-N-Deglykosylierung von murinen Leber-20S-Proteasomen mit O-GlcNAc-Nachweis über *ClickiTTM*. A) Die murinen 20S-Proteasomen wurden vor der enzymatischen Deglykosylierung mit 0,2 U OGA bzw. 10 U PNGase für 16 h bei 37 °C in der angegebenen zweifach konzentrierten Detergenz-Lösung für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert. Die chemische Deglykosylierung über β -Eliminierung erfolgte in 0,2 % (v/v) NaOH, 2 % (v/v) TEA/HPLC-Wasser für 2 h bei 52 °C. Vor der *ClickiTTM*-Markierung wurden alle Proben Methanol/Chloroform-präzipitiert. Je 1,5 µg der markierten Proben wurden anschließend über 15% ige SDS-PAGE aufgetrennt und im *semidry*-Verfahren auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Visualisierung erfolgte über Streptavidin-Peroxidase. Als Ladekontrolle diente ein AK gegen die proteasomale α 4-UE. **B**) Vor der chemischen Deglykosylierung wurden je 2 µg 20S-Proteasomen im angegebenen SDS-Puffer denaturiert oder unbehandelt belassen. Die β -Eliminierungsreaktion wurde unter denselben Puffer-Bedingungen wie zuvor für die angegebene Zeitspanne durchgeführt. Die Proben wurden ohne vorherige Methanol/Chloroform-Präzipitation über 15 % ige SDS-PAGE aufgetrennt und die Gele Coomassie-gefärbt.

Über die *ClickiTTM*-Strategie werden theoretisch alle endständigen N-Acetylglukosamin-Reste markiert. Um falsch-positive Signale durch die Detektion von poly-N-Glykosylierungen auszuschließen, wurden die 20S-Proteasomen in einem zusätzlichen Kontroll-Experiment mit Peptid-N-Glukosidase F (PNGase) verdaut (Abb. 3-4 A, Spur 5). Die Behandlung der 20S-Proteasomen mit

PNGase führte zu einer leichten Reduktion des Signals im Vergleich zur positiv-Kontrolle (Abb. 3-4 A, Spur 3). Aus der Ladekontrolle ist aber ersichtlich, dass in Spur 5 etwas weniger Material als in der Kontroll-Spur (3) aufgetragen wurde. Somit ist die Reduktion des Signals vermutlich hauptsächlich auf die geringere aufgetragene Menge an 20S-Proteasomen zurückzuführen.

Um Proteine für den immunologischen O-GlcNAc-Nachweis zu deglykosylieren wird in der Literatur die basische ß-Eliminierung des Zucker-Restes vorgeschlagen. Diese kann In-Lösung oder direkt auf der Blot-Membran erfolgen (Liu, F. et al. 2004). Die β-Eliminierung der 20S-Proteasomen In-Lösung führte zu einer völligen Auslöschung des Signals im *ClickiTTM*-Experiment. Dies galt sowohl für das O-GlcNAc-Signal, als auch für das α4-Signal der Ladekontrolle. Der Grund hierfür liegt in einer starken Hydrolyse der 20S-Proteasomen während der ß-Eliminierungsreaktion (Abb. 3-3 B). Liu et al. konnten solche Hydrolyse-Reaktionen in ihren Experimenten am tau-Protein nicht beobachten. Durch vorherige Denaturierung der 20S-Proteasomen in 0,5 % (w/v) SDS/HPLC-Wasser war es möglich, die Hydrolyse-Reaktion abzumildern. Dies weist darauf hin, dass die Zersetzung der 20S-Proteasomen nur teilweise auf basische Hydrolyse während des β-Eliminierungsprozesses zurückzuführen ist. Von Dahlmann et al. generierte Daten belegen, dass das Maximum der tryptischen 20S-Proteasom-Aktivität zwischen pH 10,5 und 11 liegt. Der Umsatz an fluorogenem tryptischen Substrat war etwa um den Faktor 40 höher, als bei pH 7 (Dahlmann et al. 1985). Es ist demnach möglich, dass die basischen β-Eliminierungsbedingungen eine auto-Proteolyse der 20S-Proteasomen bewirkten. Diese Beobachtung war vor allem in Hinblick auf den angestrebten massenspektrometrischen Nachweis der O-GlcNAc-Modifizierungen an 20S-Proteasomen interessant, da hier eine β-Eliminierung/Michael Addition-basierte Methode etabliert werden sollte. Es ist demnach nötig, die 20S-Proteasomen vor der Deglykosylierung und der β-Eliminierungsreaktion proteolytisch zu degradieren. An Peptiden konnten unter den gewählten β-Eliminierungsbedingungen keine Hydrolyse-Reaktionen beobachtet werden (Abb. 3-6).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es nicht möglich war, 20S-Proteasomen auf Protein-Ebene effektiv enzymatisch zu deglykosylieren. Für den massenspektrometrischen Nachweis von O-GlcNAc wird jedoch eine nahezu 100 %ige Deglykosylierungseffizienz benötigt. Diese lässt sich nur auf Peptid-Ebene gewährleisten, da hier keine sterischen Hinderungen auftreten. Außerdem führte die basische β -Eliminierung von 20S-Proteasomen auf Protein-Ebene zu einer starken Hydrolyse der proteasomalen UE. Für den massenspektrometrischen Nachweis hätte dies enorme

Probenverluste zur Folge, und das Auftreten unspezifischer Hydrolyse-Produkte würde zu einer Komplexitätszunahme der Proben führen.

3.2 Entwicklung und Erprobung eines neuen Derivatisierungsreagenz zum massenspektrometrischen Nachweis monomerer O-GlcNAc-Modifizierungen

Der massenspektrometrische Nachweis von O-GlcNAc-Modifizierungsstellen stellt auch 25 Jahre nach der Entdeckung dieser PTM eine besondere Herausforderung dar. Die Gründe hierfür sind das substöchiometrische Vorkommen, ionisierungssupprimierende Eigenschaften und die generelle Labilität des O-GlcNAc-Restes unter MS- und MSMS-Bedingungen. Um die analytischen Herausforderungen zu bewältigen, haben wir uns für die Etablierung einer β -Eliminierung/Michael Addition-basierten Derivatisierungsstrategie entschieden.

Unter milden basischen Bedingungen und erhöhter Temperatur wird der Serin- oder Threoningebundene O-GlcNAc-Rest abgespalten, wodurch ein Dehydroalanin- oder Dehydroamino-2buttersäure-Peptid gebildet wird. Ein geeignetes Thiol- oder Amin-Nukleophil, wie z.B. DTT oder Biotin-Pentylamin, kann anschließend an den α/β -ungesättigten Kohlenstoff der Dehydroaminosäure addiert werden (Wells *et al.* 2002).

3.2.1 Aufbau und Anforderungen an das neue Derivatisierungsreagenz Biotin-Cystamin

Das, in dieser Arbeit vorgestellte, Nukleophil setzt sich aus einem Biotin- und einem Cystamin-Baustein zusammen, welche über eine Amidbindung miteinander verknüpft wurden (Abb. 3-5). Vor dem Zusammenschluss der Carboxyl-Gruppe des Biotins mit der Amino-Gruppe des Cystamins wurden die freien Thiole der Cystamin-Bausteine über die Ausbildung von Disulfidbrücken geschützt, welche nach erfolgter Kondensationsreaktion reduziert wurden.



Abbildung 3-5: Strukturformeln von Biotin-Cystamin-d0 und Biotin-Cystamin-d4.

Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften der O-GlcNAc-Modifizierung und publizierter β -Eliminierung/Michael-Addition-assoziierter Nebenreaktionen wurde beim Design der Biotin-Cystamin-Gruppe (Bio-Cys) auf vier Gesichtspunkte besonderen Wert gelegt.

- Für die Additionsreaktion wurde ein nukleophiler Rest benötigt. Als dieser dient die Thiol-Gruppe des Cystamin-Bausteins, welche an den α/β-ungesättigten Kohlenstoff der vorher O-GlcNAc-modifizierten AS addiert wird. Besonderes Augenmerk wurde auf einen möglichst hohen Umsatz des Derivatisierungsreagenz mit O-glykosylierten Standard-Peptiden gelegt.
- 2) Unter MSMS-Bedingungen soll die eingeführte Markierung stabil sein, um eine Identifizierung des markierten Ser/Thr-Restes zu gewährleisten. Die durch die Additionsreaktion entstehende Schwefel-Kohlenstoff-Bindung ist unter CID-Bedingungen stabil, was eine Identifizierung der vorher O-GlcNAc-modifizierten AS ermöglicht. Es wurde zusätzlich untersucht, ob die Markierung selbst sogenannte Indikator-Ionen erzeugt, die ein schnelles Durchsuchen der MSMS-Daten nach modifizierten Peptiden erlauben.
- 3) Aufgrund des substöchiometrischen Vorkommens der O-GlcNAc-Modifizierung musste die Markierung eine Anreicherung derivatisierter Peptide ermöglichen. Der Biotin-Baustein gestattet eine effektive Streptavidin-Affinitätsanreicherung. Vorher ist es aber zwingend erforderlich, eine Möglichkeit zu finden, das im großen Überschuss zugegebene Markierungsreagenz effektiv von der derivatisierten Probe zu trennen.
- 4) Da die β-Eliminierung/Michael Addition nicht zu 100 % spezifisch für O-GlcNAcmodifizierte Peptide ist, soll die Markierung eine relative Quantifizierung zwischen zwei Proben innerhalb eines Massenspektrums erlauben. Dies wird durch die Einführung eines 4 Da schwereren, stabil deuterierten Strukturanalogons des Biotin-Cystamin-d0 (Bio-Cys-d0) ermöglicht. Im "schweren" Biotin-Cystamin-d4 (Bio-Cys-d4) sind die vier Kohlenstoffgebundenen Wasserstoffatome des Cystamin-Bausteins durch Deuterium ausgetauscht (Abb.3-5). Hierdurch wird eine Unterscheidung zwischen spezifisch und unspezifisch markierten Peptiden ermöglicht.

Im Folgenden wurde unter Verwendung verschiedener Standard-Peptide und tryptisch verdautem α -Crystallin untersucht, ob das hier vorgestellte Derivatisierungsreagenz diese Anforderungen

erfüllt. Die Verwendung von tryptisch verdautem α -Crystallin war sinnvoll, da bestimmte Fragestellungen die Simulation eines komplexen Peptid-Gemisches erforderten.

3.2.2 Untersuchung der Derivatisierungseffizienz von Biotin-Cystamin-d0

Die Derivatisierungseffizienz wurde an je 10 pmol der synthetischen Standard-Peptide AIPV**S**(β -O-GlcNAc)REEKPSSAPSS und FVFDRPLPV**S**(α -O-GalNAc)R, im Folgenden als O-GlcNAc- und O-GalNAc-Peptid bezeichnet, untersucht. Die Vollständigkeit der β -Eliminierung/Michael Additionsreaktion für Bio-Cys-d0 wurde mit der des etablierten Nukleophils DTT verglichen.

In der Literatur findet man unterschiedliche Derivatisierungsprotokolle für den β -Eliminierung/Michael Addition-basierten Nachweis von O-GlcNAc-Modifizierungen (Tab. 3-1).

Tabelle 3-1: Reaktionsbedingungen für die β-Eliminierung/Michael Addition von S- und N-Nukleophilen an O-glykosylierten Peptiden und Proteinen.

Literatur	β-Eliminierung/Michael Additions-Bedingungen
Wells et al. 2002	10 mM DTT oder 20 mM Biotin-Pentylamin; 0,1 % (v/v) NaOH/1 % (v/v) TEA, 0-20 % (v/v)
	Ethanol in Wasser, pH 12-12,5
	Inkubation: 2,5 h bei 50 °C
Ball et al. 2006	20 mM DTT; 0,2 % (v/v) NaOH/2 % (v/v) TEA in Wasser, pH 12-12,5
	Inkubation: 2 h bei 56 °C
Vosseller et al. 2005	20 mM DTT; 0,15 % (v/v) NaOH/1,5 % (v/v) TEA in Wasser, pH 12-12,5
	Inkubation: 1,5 h bei 52 °C
Hédou et al. 2009	20 mM DTT; 0,15 % (v/v) NaOH/1,5 % (v/v) TEA, 20 % (v/v) Ethanol in Wasser, pH 12-12,5
	Inkubation: 4 h bei 52 °C
Wang et al. 2009	20 mM DTT; 0,15 % (v/v) TEA in Wasser, pH 12-12,5 mit NaOH eingestellt
-	Inkubation: 4 h bei 52-54 °C
Klement et al. 2010	50 mM Cystamin Hydrochlorid, 250 mM NaOH in Wasser, pH keine Angabe
	Inkubation: 3 h bei 37 °C

Ziel war es, einen möglichst hohen Umsatz zu erreichen und das Auftreten unerwünschter Nebenprodukte zu minimieren. Im Rahmen vorangegangener Arbeiten wurden intensive Studien zu diesem Thema durchgeführt, welche hier kurz zusammengefasst dargestellt sind (Overath, Diplomarbeit).

Tabelle 3-2: Verwendete β-Eliminierung/Michael Additionsbedingungen.

Parameter	Bedingungen
Inkubationstemperatur	52 °C
Inkubationszeit	2 Stunden
Zusammensetzung der	5 mM Bio-Cys oder 10 mM DTT; 0,2 % (v/v) NaOH/2 % (v/v) TEA in HPLC-Wasser,
Derivatisierungslösung	pH12,5

Eine zu hohe Basizität (> 0,2 % (v/v) NaOH/0,2 % (v/v) TEA, pH 12,5) der Reaktionslösung kann zu basekatalysierter Peptid-Hydrolyse (Greis *et al.* 1996), Amidierung des C-Terminus eines Peptides (-1 Da) und zur Umwandlung von Arginin zu Ornithin (- 42 Da) führen (eigene Beobachtungen). Ähnliche Nebenreaktionen, ausgenommen die Deamidierung des C-Terminus, zeigen sich, wenn die Inkubationstemperatur zu hoch gewählt wird (> 56 °C).

Unter Berücksichtigung der Vorversuche und der Literaturdaten wurden die, in Tabelle 3-2 aufgelisteten, Reaktionsbedingungen gewählt.



Abbildung 3-6: Vergleich der Derivatisierungseffizienz zwischen Bio-Cys-d0 und DTT am O-GlcNAc-Peptid. Dargestellt sind die MALDI-TOF/TOF MS-Spektren des O-GlcNAc-Peptides AIPVS(β -O-GlcNAc)REEKPSSAPSS vor der Derivatisierung (A), nach dem Umsatz mit DTT (B) und Bio-Cys-d0 (C), sowie die Formel, nach welcher der prozentuale Umsatz des O-GlcNAc-Peptides mit dem verwendeten Derivatisierungsreagenz berechnet wurde (D).

Aus den Intensitäten der einzelnen Derivatisierungsprodukte wurde der prozentuale Umsatz nach der in Abbildung 3-6 D dargestellten Formel berechnet. Als nicht umgesetzt wurden die Signale des O-GlcNAc-Peptides (m/z 1845,10) und des Dehydroderivates (m/z 1623,88) betrachtet (Abb. 3-6). Das Dehydropeptid entsteht durch die Eliminierung der O-GlcNAc-Gruppe ohne anschließende

Addition des Nukleophils. Die m/z-Werte der derivatisierten Peptide (1777,90 für DTT und 1927,01 bzw. 1908,99 [1927,01 – H₂O] für Bio-Cys-d0) wurden als umgesetzt betrachtet.

Die Derivatisierungseffizienz mit Bio-Cys-d0 lag unter den gewählten β -Eliminierung/Michael Additionsbedingungen bei 85 % (35 % O-GalNAc-Peptid, Daten nicht gezeigt) und für DTT bei 88 % (40 % O-GalNAc-Peptid, Daten nicht gezeigt).

Die Derivatisierungseffizienz setzt sich aus zwei Parametern zusammen - dem tatsächlichen Umsatz des glykosylierten Peptides mit dem jeweiligen Derivatisierungsreagenz und den eventuell veränderten Ionisierungseigenschaften des umgesetzten Peptides gegenüber dem Ausgangspeptid. Im Rahmen massenspektrometrischer Untersuchungen an biotinylierten Desoxyribonukleinsäuren konnten Liu et al. deutliche Ionisierungssteigerungen der biotinylierten Spezies gegenüber ihren nichtbiotinylierten Analoga beobachten (Liu, Z. et al. 2003). In einer ß-Eliminierung/Michael Addition-basierten Studie über ionisierungssteigernde Effekte verschiedener S- und N-Nukleophile im Bereich der Phospho-Analytik zeigten Substanzen, welche mindestens ein sekundäres Amin in ihrer Struktur enthielten, durchweg erhöhte Signal-Intensitäten (Klemm et al. 2004). Das hier vorgestellte Biotin-Cystamin enthält ein Diamid, welches am Biotin-Rest lokalisiert ist. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Ausbildung mesomerer Grenzstrukturen positive Ladungen kurzzeitig stabilisiert und so ein ionisierungsfördernder Effekt hervorgerufen werden könnte. Demgegenüber zeigte 1,2-Ethandithiol, ein dem DTT ähnliches Derivatisierungsreagenz, in der Studie von Klemm et al. keine Signal-steigernden Eigenschaften. Die wahrscheinlichere Erklärung für ionisierungsfördernde Effekte durch Bio-Cys-d0 ist aber, dass biotinylierte Peptide aufgrund ihrer erhöhten Hydrophobizität besser in das Kristallgitter der MALDI-Matrix inkorporiert und daher effektiver ionisiert werden (Beavis und Bridson 1993).

Zusammenfassend lassen diese Daten die Schlussfolgerung zu, dass der Umsatz mit DTT vollständiger abläuft. Zurückzuführen ist dies vermutlich auf die, im Vergleich zu DTT, geringere Konzentration an Bio-Cys-d0 in der β-Eliminierung/Michael Additionslösung. Zusätzlich verstärkt wird dies durch die Neigung von Bio-Cys-d0, in Lösung Disulfide zu bilden (Abb. 3-9 D). Eine Erhöhung der Konzentration (>10 mM) führte aufgrund der hohen Hydrophobizität von Bio-Cys-d0 zur Bildung von Niederschlägen in der Derivatisierungslösung. Durch die ionisierungssteigernden Eigenschaften des Bio-Cys-d0 zeigen beide Nukleophile identische Derivatisierungseffizienzen. Höhere Ausbeuten könnten erzielt werden, wenn man die Derivatisierungsbedingungen verändert, also die Basizität, die Inkubationstemperatur oder –Zeit erhöht. Dies wäre aber gleichzeitig mit einer

Zunahme unerwünschter Nebenprodukte verbunden. Die Zunahme der Proben-Komplexität durch Nebenprodukte und eine eventuelle Steigerung des Umsatzes um weitere 5 % würden in keinem Verhältnis zueinander stehen. Für alle folgenden Versuche wurden die in Tabelle 3-2 aufgelisteten Derivatisierungsbedingungen verwendet.

3.2.3 Tandemmassenspektrometrie Biotin-Cystamin-derivatisierter Peptide

Aufgrund der Labilität der β-O-glykosidischen Bindung unter CID-Bedingungen ist eine direkte Identifizierung O-GlcNAc-modifizierter Ser/Thr-Reste nahezu unmöglich (Chalkley und Burlingame 2003). Die Bio-Cys-d0-Gruppe sollte stabil genug sein, um eine MSMS-Identifizierung der vorher modifizierten Aminosäure zu ermöglichen. Außerdem sollte untersucht werden, ob während der Fragmentierung des Bio-Cys-d0-markierten O-GlcNAc-Peptides Indikator-Ionen generiert werden. Das O-GlcNAc-Peptid bot sich aufgrund seiner Aminosäure-Zusammensetzung besonders für die tandemmassenspektrometrische Charakterisierung Bio-Cys-d0-derivatisierter O-GlcNAc-Peptide an. Es enthält fünf Ser-Reste und somit fünf potentielle Derivatisierungspositionen. Die O-GlcNAc-Modifizierung konnte über die eingeführte Markierung in der y-Ionenreihe sowie der b-Ionenreihe eindeutig Ser5 zugeordnet werden (Abb. 3-7).



Abbildung 3-7: MALDI-TOF/TOF MSMS des Bio-Cys-d0 derivatisierten O-GlcNAc-Peptides. Dargestellt ist das Fragment-Spektrum des Bio-Cys-d0-markierten O-GlcNAc-Peptides AIPV**S**(β -O-GlcNAc)REEKPSSAPSS. Markiert sind die y- und b-Ionen sowie die Indikator-Ionen bei m/z 227, 304, 328 und [MH – 303]⁺.

Während der Fragmentierung erzeugte der Bio-Cys-d0-Rest mehrere Indikator-Ionen. Das Signal bei m/z 304,13 entspricht dem einfach geladenen Bio-Cys-d0 und das bei m/z 1624,84 dem Neutralverlust-Ion $[MH - 303]^+$. Bei m/z 227,08 handelt es sich um das b-Ion von Bio-Cys-d0

(Biotinyl-Gruppe), welches durch die Fragmentierung an der Amidbindung zwischen Biotin und Cystamin entsteht. Ein weiteres Indikator-Ion stellt das Signal bei m/z 328,12 dar - es entspricht Bio-Cys-d0 + 24 Da. Die Indikator-Ionen für die mit dem stabil deuterierten Strukturanalogon Bio-Cys-d4 derivatisierten Peptide waren demnach bei m/z 227,08; 308,13; 332,12 und [MH – 307]⁺ zu detektieren (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die β -Eliminierung/Michael Addition mit Bio-Cys-d0 eine eindeutige Identifizierung von O-GlcNAc-Modifizierungspositionen ermöglichte. Zusätzlich erzeugte die Markierung abundante Indikator-Ionen, welche ein schnelles und automatisches Durchsuchen von Fragment-Spektren nach potentiell O-GlcNAc-modifizierten Kandidaten ermöglicht. Das Signal bei m/z 227 ist hierfür jedoch nicht geeignet, da Ionen mit ähnlichen m/z-Werten häufig in MALDI MSMS-Spektren detektiert werden können. Hierbei handelt es sich vermutlich um ein Kalium-Addukt von CHCA (MALDI-Matrix), welches ein Kontaminationssignal bei m/z 228,0 erzeugt (Keller und Li 2000).

3.2.4 Die Entfernung von überschüssigem Biotin-Cystamin-d0 über Größenausschluss-Chromatographie

Eine große Herausforderung stellte das Entfernen des, im Überschuss zur Probe gegebenen, ist Derivatisierungsreagenz Dies zwingend erforderlich, dar. um eine effiziente Affinitätsanreicherung biotinylierter Peptide an Streptavidin zu gewährleiten. Prinzipiell kann die Derivatisierung mit Bio-Cys-d0 an intakten Proteinen oder an proteolytisch prozessierten Proteinen, also auf Peptid-Ebene, durchgeführt werden. Der Vorteil der Markierung auf Protein-Ebene ist, dass sich das Derivatisierungsreagenz sehr unkompliziert über Ethanol- oder Methanol/Chloroform-Präzipitation aus der Lösung entfernen lässt. Im vorigen Kapitel (3.1.2) konnte jedoch demonstriert werden, dass die Deglykosylierung mit lysosomalen O-GlcNAcasen, speziell an 20S-Proteasomen, sehr ineffizient verläuft. Des Weiteren führte die β-Eliminierung an intakten 20S-Proteasomen zu starken Hydrolyse-Reaktionen. Aus diesem Grund mussten alle Derivatisierungsreaktionen auf Peptid-Ebene durchgeführt, wodurch eine alternative Möglichkeit zum Entfernen des Derivatisierungsreagenz gefunden werden musste.

Über C18-RP-Entsalzung war es nicht möglich, das underivatisierte Nukleophil von den Peptiden zu trennen (Daten nicht gezeigt). In der Literatur finden sich Beispiele, in denen Biotin-Markierungsreagenzien über Kationaustausch-Chromatographie (SCX, engl. *strong cation exchange chromatography*) von Peptid-Gemischen getrennt wurden (Wang, Z. *et al.* 2009). Ein Nachteil dieser

Strategie ist, dass die SCX-Eluate vor der Affinitätsanreicherung einem zusätzlichen Entsalzungsschritt unterzogen werden müssen, was zu starken Proben-Verlusten führen kann. Um diese zu vermeiden, wurde hier erstmals der Versuch unternommen, überschüssiges Derivatisierungsreagenz über Größenausschluss-Chromatographie (SEC, engl. *size exclusion chromatography*) aus den Proben zu entfernen.

Um zu untersuchen, ob die Gelpermeationschromatographie eine geeignete Methode darstellt, das hier vorgestellte Derivatisierungsreagenz von einer komplexen Peptid-Mischung zu trennen, wurden 50 μ l einer 10 mM Bio-Cys-d0-Lösung zu 10 μ g tryptisch verdautem α -Crystallin gegeben (ohne Derivatisierung). Das Ziel war, Bio-Cys-d0 aus der komplexen Lösung zu entfernen, ohne quantitative und qualitative Peptid-Verluste zu verzeichnen. Die Probe wurde auf eine *Superdex Peptide* PC 3.3/30 Gelfiltrationssäule gegeben. Der optimale Trennbereich dieser Säule liegt zwischen 100 und 7000 Da. Es sollte demnach möglich sein, freies Bio-Cys-d0 (m/z 304,11) und Bio-Cys-d0-Disulfide (m/z 605,21), die in wässriger Lösung entstehen, vom Peptid-Gemisch zu trennen.

Vor der Gelpermeationschromatographie wurde das MALDI-TOF/TOF MS-Spektrum von Signalen des Bio-Cys-d0-Disulfides und tryptischen Peptiden des α -Crystallins dominiert (Abb. 3-8 A). Die UV-Spur (214 nm), welche während der Größenausschluss-Chromatographie aufgezeichnet wurde, zeigte, dass sich die Probe in mehrere *Peaks* auftrennen ließ (Abb. 3-8 B). Die massenspektrometrische Analyse aller Fraktionen ergab, dass die Peptide in den Fraktionen 18 bis 39 und Bio-Cys-d0 in den Fraktionen 42 bis 52 eluierten. Das MALDI-TOF/TOF MS-Spektrum der vereinten Peptid-Fraktionen zeigte den typischen PMF von α -Crystallin (Abb. 3-8 C). Qualitative Peptid-Verluste waren nicht zu verzeichnen. Selbst niedermolekulare Peptide (m/z 810,43 und 633,32) konnten sauber von Bio-Cys-d0 und dem Bio-Cys-d0-Disulfid getrennt werden. Demgegenüber war im Spektrum des Bio-Cys-d0-Pools fast ausschließlich das Signal des Bio-Cys-d0-Disulfides zu detektieren (bei entsprechend gewähltem Messbereich auch das Signal für Bio-Cys-d0, Daten nicht gezeigt) und nur einige Peptid-Signale im *m*/z-Bereich < 700 (Abb. 3-8 D).

Die Ergebnisse zeigen, dass es möglich war, das überschüssige Derivatisierungsreagenz effektiv von den tryptischen α -Crystallin-Peptiden zu trennen. Da mit HPLC-Wasser eluiert wurde, war kein zusätzlicher Entsalzungsschritt vor der Lyophilisation der vereinten Peptid-Fraktionen nötig, was einen großen Vorteil gegenüber der üblicherweise verwendeten Kationenaustausch-Chromatographie

darstellt. Somit waren optimale Voraussetzungen für die anschließende Streptavidin-Anreicherung der biotinylierten Peptide geschaffen.



Abbildung 3-8: Trennung von Bio-Cys-d0 und tryptisch verdautem α -Crystallin über Größenausschluss-Chromatographie. Gezeigt sind die MALDI-TOF/TOF MS-Spektren von 10 µg, in 50 µl 10 mM Bio-Cys-d0 gelöstem, tryptisch verdautem α -Crystallin vor der Größenausschluss-Chromatographie (A), die UV-Spur der Gelfiltration (B) und das MALDI-TOF/TOF MS-Spektrum der vereinten Peptid-Fraktionen (C), sowie der Bio-Cys-d0-Fraktionen (D) nach der Gelfiltration.

3.2.5 Effektivität der Streptavidin-Anreicherung biotinylierter Peptide

Substöchiometrische posttranslationale Modifizierungen, wie die mit monomerem N-Acetylglukosamin, machen es erforderlich, die Proben vor der massenspektrometrischen Analyse anzureichern.

Der Biotin-Baustein des Biotin-Cystamins bietet die Möglichkeit einer effektiven Affinitätsanreicherung über Streptavidin, welches an ein magnetisches Trägermaterial gekoppelt ist (*Dynabeads MyOneTM Streptavidin T1*, Invitrogen). Um die Anwendbarkeit der Streptavidin-Anreicherung für substöchiometrisch vorkommende Peptide zu untersuchen, wurden 5 pmol des am

N-Terminus biotinylierten Peptides Biotin-CKIGFFKRPLKKKMEK (Biotin-Peptid) mit 400 pmol tryptisch verdautem α -Crystallin vermischt. Dies war sinnvoll, da Proteine nur bis zu maximal zehn Prozent glykosyliert vorliegen. Die Proben-Zusammensetzung sollte die Situation simulieren, wie sie für ein tryptisch verdautes O-GlcNAc-modifiziertes Protein nach Bio-Cys-Derivatisierung zu erwarten war.



Abbildung 3-9: Effektivität der Streptavidin-Anreicherung biotinylierter Peptide. Anreicherung des N-terminal biotinylierten Peptides (Biotin-Peptid, Biotin-CKIGFFKRPLKKKMEK, m/z 2161.26) an magnetischen Streptavidin-Kugeln. 5 pmol Biotin-Peptid wurden mit 400 pmol tryptisch verdautem α -Crystallin vermischt. (A) Dargestellt sind die MALDI-TOF/TOF MS-Spektren vor und (B) nach der Streptavidin-Anreicherung.

Die in Bindungspuffer gelöste Probe wurde auf die *Dynabeads* gegeben und nichtbiotinylierte Peptide durch exzessives Waschen vom Trägermaterial entfernt. Das MALDI-TOF/TOF MS-Spektrum vor der Affinitätsanreicherung zeigt das Muster des tryptisch verdauten α -Crystallins (Abb. 3-9 A). Das Signal des zugesetzten Biotin-Peptides (*m*/*z* 2161,26) war nicht zu detektieren. Nach der Streptavidin-Anreicherung war das MS-Spektrum von Signalen des biotinylierten Peptides dominiert (Abb. 3-9 B). Die MSMS-Analyse ergab eine Zuordnung zum intakten und tryptisch

verdauten Fragmenten des Biotin-Peptides (m/z 1516,88 Biotin-CKIGFFKRPLK; m/z 1644,98 Biotin-CKIGFFKRPLKK; m/z 1773,08 Biotin-CKIGFFKRPLKKK), sowie einem tryptischen Peptid der α -B-Kette von α -Crystallin (m/z 1374,71 ₁₂RPFFPFHSPSR₂₂).

Das Auftreten tryptischer Spaltprodukte des Biotin-Peptides ist dadurch zu erklären, dass keine Versuche unternommen wurden, das Trypsin aus dem α -Crystallin-Verdau zu inaktivieren. Die relativ ineffiziente Abreicherung des Peptides ₁₂RPFFPFHSPSR₂₂ ist vermutlich durch hydrophobe Wechselwirkungen der Phe-, Pro- und des His-Restes mit der Oberfläche der *Dynabeads* oder dem gekoppelten Streptavidin zu erklären.

3.2.6 Relative Quantifizierung zwischen Biotin-Cystamin-d0- und -d4-markierten Glyko-Peptiden

Das Auftreten unspezifischer β-Eliminierung/Michael Additionsprodukte ist ein seit langem bekanntes Problem. In der Literatur finden sich viele Studien, welche das Ziel verfolgten diese zu charakterisieren und durch veränderte Reaktionsbedingungen zu vermeiden. Diese Studien beziehen sich vor allem auf die Derivatisierung von Phospho-Peptiden. Li et al. konnten beispielsweise zeigen, dass unter den von Meyer et al. und Jaffe et al. verwendeten Derivatisierungsbedingungen neben spezifischen Produkten, auch verstärkt Umsätze an unphosphorylierten Ser/Thr-Resten zu detektieren waren. Die Erniedrigung der Reaktionstemperatur von ursprünglich 50 °C auf 4 °C konnte die Entstehung von unspezifischen Derivatisierungsprodukten zwar abmildern, aber nicht gänzlich verhindern (Meyer et al. 1986; Jaffe et al. 1998; Li, W. et al. 2003). Es ist bekannt, dass bestimmte Metallionen den β-Eliminierung/Michael Additionsprozess beschleunigen (Sundararajan et al. 1958; Byford 1991). Basierend auf diesen Erkenntnissen schlussfolgerten McLachlin und Chait, dass Metallionen, welche in Spuren in den Reaktionslösungen vorkommen, für unspezifische Derivatisierungen von Ser/Thr-Resten verantwortlich sind. Um diese zu binden, fügten sie ihrer Derivatisierungslösung den Chelatkomplex-Bildner Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) hinzu, wodurch die Bildung unspezifischer Nebenprodukte um den Faktor zehn verringert werden konnte. Ein großer Nachteil dieser Strategie war aber, dass auch die Bildung spezifischer Derivate teilweise oder gänzlich unterbunden wurde (McLachlin und Chait 2003).

Da das Auftreten unspezifischer Derivate in einer komplexen proteolytisch prozessierten Probe nie gänzlich vermieden werden kann, wurde in der vorliegenden Arbeit eine relative Quantifizierungsstrategie verfolgt. Diese sollte es möglich machen, innerhalb eines MS-Spektrums

zwischen spezifischen und unspezifischen β -Eliminierung/Michael Additionsprodukten zu unterscheiden.

Hierfür wurde die in Lösung vorliegende Probe im Verhältnis 1:1 auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt. Ein Teil wurde enzymatisch mit β -N-Acetylglukosaminidase deglykosyliert. Anschließend wurde die glykosylierte Probe (-OGA) mit Bio-Cys-d0 und die deglykosylierte Probe (+OGA) mit dem strukturell identischen aber vier Dalton schwereren Bio-Cys-d4, welches am Cystamin-Baustein stabil deuteriert ist, umgesetzt. Nach der Derivatisierung wurden beide Proben vereint. Indem man die Signal-Intensitäten der monoisotopischen Massen der leicht (Bio-Cys-d0) und schwer (Bio-Cys-d4) markierten Peptide aufeinander bezog, war man in der Lage, innerhalb eines MS-Spektrums zwischen unspezifischen und spezifischen β -Eliminierung/Michael Additionsprodukten zu unterscheiden. Für unspezifisch markierte Peptide sollte das leicht/schwer-Verhältnis (L/H) ~ 1 betragen, für spezifisch derivatisierte, vormals O-GlcNAc-modifizierte Peptide, sollte L/H > 2 sein.



Abbildung 3-10: Relative Quantifizierung Bio-Cys-d0/d4-markierter Standard-Peptide. Je 20 pmol der Standard-Peptide O-GalNAc-Peptid und O-GlcNAc-Peptid wurden untersucht. Die Proben wurden 1:1 aufgeteilt. Ein Teil der Probe wurde mit OGA deglykosyliert, die andere Probe in OGA-Puffer gelöst. Anschließend wurde die -OGA-Probe mit Bio-Cys-d0 und die +OGA-Probe mit Bio-Cys-d4 derivatisiert und wieder vereint. Dargestellt sind die resultierenden MALDI-TOF/TOF MS-Spektren für das O-GalNAc-Peptid (A) und das O-GlcNAc-Peptid (B).

Am O-GalNAc- und O-GlcNAc-Peptid wurde die Strategie der relativen Quantifizierung getestet. Beide Peptide sollten in nachfolgenden Experimenten als interne Kontroll-Peptide dienen. Da α -O-glykosidische Bindungen durch OGAs nicht hydrolysiert werden können, war das zu erwartende L/H-Verhältnis für das O-GalNAc-Peptid ~ 1. In Abbildung 3-10 sind die resultierenden

Spektren für das O-GalNAc-Peptid (A) und das O-GlcNAc-Peptid (B) exemplarisch gegenübergestellt. Das L/H-Verhältnis der vier Dalton auseinanderliegenden Derivatisierungsprodukte des O-GalNAc-Peptides betrug in dem dargestellten Beispiel 1,16. Der Versuch wurde mehrfach wiederholt. Die L/H-Verhältnisse des α -GalNAc-Peptides lagen durchschnittlich bei 1 ± 0,2. Für das O-GlcNAc-Peptid war kein Signal des deglykosylierten Bio-Cys-d4-markierten Peptides im MS-Spektrum zu detektieren.

Es wurde gezeigt, dass es durch die Markierung mit Bio-Cys-d0 (-OGA) und Bio-Cys-d4 (+OGA) möglich war, zwischen glykosylierter und deglykosylierter Probe innerhalb eines MS-Spektrums zu unterscheiden. Weiterhin war ersichtlich, dass sich beide Glyko-Peptide als interne Standards für die relative Quantifizierung eigneten - das O-GlcNAc-Peptid als Kontrolle für eine effiziente Deglykosylierung und das O-GalNAc-Peptid als interner Standard für die relative Quantifizierung. Wich der ermittelte L/H-Wert des O-GalNAc-Peptides, aufgrund leicht unterschiedlicher Derivatisierungsbedingungen oder Pipettierfehler, von eins ab, wurden die L/H-Verhältnisse aller anderen detektierten Derivatisierungsprodukte aus einer komplexen Probe auf das des O-GalNAc-Peptides normalisiert. Schlussfolgernd wurden beide Glyko-Peptide bei den anschließenden Analysen komplexer tryptischer Peptid-Proben als Kontroll-Peptide mitgeführt. Eine Ausnahme stellte α -Crystallin dar, da die Sequenz des O-GlcNAc-Peptides der des bekannten glykosylierten Peptides der α -A-Kette₁₅₈₋₁₇₃ von α -Crystallin entstammt.

Die Peptide wurden den Proben nach der Oxidation, dem tryptischen In-Lösung-Verdau und der Hitzeinaktivierung des Trypsins und vor dem Aufteilen der Proben zudotiert. Das O-GalNAc-Peptid wurde aufgrund seiner verminderten Derivatisierungseffizienz mit 80 pmol und das O-GlcNAc-Peptid mit 20 pmol eingesetzt.

3.2.7 Anwendung der neuen Derivatisierungsstrategie zum Nachweis der O-GlcNAc-Modifizierung an Ser 162 des Modell-Proteins α-Crystallin

Nach Abschluss der Voruntersuchungen wurde die vorgestellte Methode zum Nachweis einer bekannten O-GlcNAc-Modifizierung an α -Crystallin verwendet. Des Weiteren sollten die Auswirkungen der Bio-Cys-d0/d4-Markierung auf das Elutionsverhalten derivatisierter tryptischer Peptide in der Umkehrphasen-Chromatographie charakterisiert werden.

Nachweis der bekannten O-GlcNAc-Modifizierung an Ser162 von α -Crystallin vor C18-Umkehrphasen-Chromatographie

Das kleine Hitzeschock Protein (sHSP, engl. *small heat shock protein*) α -Crystallin bildet polydisperse heterooligomere Komplexe mit einem 3:1-Verhältnis zwischen α -A- und α -B-Untereinheiten. Es ist ein Hauptstruktur-Protein der Augenlinse. Indem es strukturell veränderte Proteine in ihre Ausgangskonformation faltet, nimmt es eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung der Linsen-Transparenz ein. Dies ist essenziell, da Proteine hier über die gesamte Lebensspanne eines Individuums posttranslationalen Veränderungen ausgesetzt sind. Alpha-Crystallin selbst ist stark posttranslational modifiziert - unter anderem mit monomerem N-Acetylglukosamin. In der α -A-UE kann Ser162 und in der α -B-UE Thr170 O-GlcNAc-modifiziert werden (Roquemore *et al.* 1992; Roquemore *et al.* 1996). Dieser Umstand und die Tatsache, dass eine α -Crystallin-UE mit ca. 20 kDa etwa die gleiche Größe wie eine proteasomale UE besitzt (21 bis 32 kDa), machten es zum idealen Test-Protein.

Am Beispiel von α -Crystallin soll die β -Eliminierung/Michael Addition-basierte relative Quantifizierungsstrategie zum Nachweis von O-GlcNAc-Modifizierungen einmal kurz erläutert werden. Graphisch ist der Versuchsablauf in Abbildung 3-11 dargestellt.

Für den Nachweis wurde das bovine α-Crystallin zunächst in einer Perameisensäure-Atmosphäre oxidiert. Durch die Oxidation sollte der unspezifische Umsatz an Cys/Met-Resten verhindert werden. Anschließend wurde die Probe tryptisch In-Lösung-verdaut. Nach Hitzeinaktivierung des Trypsins wurde dem Verdau das O-GalNAc-Peptid zudotiert (bei HSP90 und 20S-Proteasomen außerdem das O-GlcNAc-Peptid) und die Probe im Verhältnis 1:1 auf zwei neue Reaktionsgefäße aufgeteilt. Ein Teil wurde enzymatisch mit O-GlcNAcase deglykosyliert, um im Endeffekt zwischen deglykosylierter und glykosylierter Probe unterscheiden zu können. Anschließend wurden beide Proben dephosphoryliert, um den Umsatz an phosphorylierte Ser/Thr-Resten zu unterbinden. Der glykosylierte Teil wurde mit Bio-Cys-d0, der deglykosylierte mit Bio-Cys-d4 umgesetzt. Nach abgeschlossener Derivatisierung wurden beide Proben wieder vereint und das überschüssige Bio-Cys-d0/d4 über Gelpermeationschromatographie aus der Lösung entfernt. Anschließend an die Streptavidin-Affinitätsanreicherung der biotinylierten Peptide wurden 10 % der Lösung direkt auf eine MALDI-Platte aufgetragen, um die Effektivität der Anreicherung zu kontrollieren. Die restlichen 90 % wurden für spätere LC-MALDI-Analysen verwendet.



Abbildung 3-11: Graphische Dartellung der β-Eliminierung/Michael Addition-basierten relativen Quantifizierungsstrategie mit Bio-Cys-d0/d4.

Vergleicht man die MALDI-TOF/TOF MS-Spektren vor und nach der Streptavidin-Affinitätschromatographie (Abb. 3-12), sieht man, dass fast ausschließlich Bio-Cys-d0/d4derivatisierte Peptide angereichert wurden. Ein Großteil von ihnen zeigte ein L/H-Verhältnis von eins, was auf einen unspezifischen Umsatz mit Bio-Cys-d0/d4 hinweist (Abb. 3-12 B). Hier wird die Notwendigkeit einer relativen Quantifizierungsstrategie deutlich, wenn das Ziel einer Studie der β -Eliminierung/Michael Addition-basierte Nachweis monomerer O-GlcNAc-Modifizierungen ist. Eines der drei abundantesten Signale konnte dem, an Ser162 der α -A-UE O-GlcNAc-modifizierten Peptid ₁₅₈AIPVS(Bio-Cys-d0/d4)R₁₆₃ zugeordnet werden (Abb. 3-12 B). In dem gezeigten Spektrum betrug das L/H-Verhältnis 2,4.



Abbildung 3-12: MALDI-TOF/TOF MS-Spektren vor und nach Streptavidin-Anreicherung Bio-Cys-d0/d4derivatiserter Peptide von α -Crystallin. Dargestellt sind die MALDI-TOF/TOF MS-Spektren für α -Crystallin vor (A) und nach der Streptavidin-Anreicherung (B), sowie der vergrößerte Bereich des an Ser162 O-GlcNAc-modifizierten Peptides der α -A-Kette von α -Crystallin ₁₅₈AIPVS(Bio-Cys-d0/d4)R₁₆₃ (*m/z* 927,49/931,51; L/H 2,4). Die L/H-Verhältnisse der zusätzlich markierten Peptid-Paare sind in Tabelle 3-3 dargestellt.

3.2.8 Evaluierung des Isotopen-Effektes Bio-Cys-d0/d4-markierter Peptide während der C18-Umkehrphasen-Chromatographie

Um komplexe, proteolytisch prozessierte Peptid-Gemische massenspektrometrisch zu analysieren, ist es üblich, diese vor der Messung chromatographisch aufzutrennen. In der Regel geschieht dies über C18-Umkehrphasen-Chromatographie. Das Trennprinzip beruht auf unterschiedlichen Wechselwirkungen hydrophiler und hydrophober Seitenketten der Analyten mit der unpolaren stationären Phase - hier C18-Kohlenstoff-Ketten - und der polaren mobilen Phase - hier ein Acetonitril/Wasser-Gradient. Je hydrophober ein Peptid ist, desto stärker interagiert es mit der unpolaren stationären Phase, und umso höher muss der organische Lösemittel-Anteil sein, damit sich dieses in der mobilen Phase löst und von der Säule eluiert. Dies hat eine Verringerung der Proben-Komplexität zur Folge, wodurch einige Peptide, welche im Gesamtspektrum nicht zu detektieren

sind, sei es Stöchiometrie-bedingt oder durch ionisierungssupprimierende Effekte anderer Ionen, nach der C18-RP nachgewiesen werden können.

Es ist bekannt, dass strukturanaloge, mit schweren Isotopen markierte Analyten im Vergleich zu unmarkierten Analyten in der Umkehrphasen-Chromatographie ein verändertes Elutionsverhalten zeigen. Dies kann dazu führen, dass sie sich chromatographisch vollständig voneinander trennen lassen, was eine relative Quantifizierung innerhalb eines MS-Spektrums unmöglich macht. Vor allem für deuterierte Analyten lassen sich diese Isotopen-Effekte häufig beobachten. Prinzipiell gilt: Je mehr Deuterium-Atome in ein Molekül inkorporiert werden, desto stärker wirkt sich der Isotopen-Effekt auf das Elutionsverhalten aus. Dieser Effekt kann durch die Platzierung des Deuteriums nahe hydrophiler Nachbargruppen, der Verringerung der Anzahl an Deuterium-Atomen oder durch die Verwendung eines relativ großen Derivatisierungsreagenz verringert oder beseitigt werden (Zhang, R. et al. 2002). Bio-Cys-d4 hat eine Masse von 307 Da und ist damit etwa so groß wie das achtfach deuterierte ICAT-d8-Reagenz (engl. *isotope coded affinity tag*, $M_r = 442$ Da), welches zur relativen massenspektrometrischen Quantifizierung von Peptiden verwendet wird. Außerdem ähneln sich beide stark in ihrer Struktur. Für ICAT-d8 konnten ebenfalls Isotopen-Effekte beobachtet werden, welche aber aufgrund der Größe der Markierung schwach ausgeprägt waren. Die Länge der markierten Peptide hatte zusätzlich Einfluss auf das Elutionsverhalten. So unterlagen kurzkettige Peptide eher dem Isotopen-Effekt als langkettige (Zhang, R. et al. 2002).



Bio-Cys-d0 (glykosyliert) Bio-Cys-d4 (deglykosyliert)



Abbildung 3-13: Auswirkung des Isotopen-Effektes auf das Laufverhalten Bio-Cys-d0/d4-derivatiserter Peptide in der C18-RP-nano-HPLC. Gezeigt sind die MALDI-TOF/TOF MS-Intensitäten über den LC-Elutionsverlauf des O-GlcNAc-modifizierten Bio-Cys-d0/d4-markierten Peptides α -A₁₅₈₋₁₆₃ (*m/z* 927.50) und des unspezifisch markierten Peptides α -A₅₀₋₅₄ (*m/z* 918.44) von α -Crystallin.

Auch für Bio-Cys-d0/d4-derivatisierte Peptide konnten schwache Isotopen-Effekte, also Verschiebungen in den Retentionszeiten zwischen Bio-Cys-d0- und Bio-Cys-d4-markierten Peptiden, beobachtet werden. Bio-Cys-d4-markierte Peptide eluierten etwas früher als ihre nichtdeuterierten Partner (Abb. 3-13).

Aus diesem Grund war es essenziell zu untersuchen, ob trotz des leicht verzögerten Laufverhaltens in der Umkehrphasen-Chromatographie eine relative Quantifizierung zwischen Bio-Cys-d0/d4markierten Peptiden möglich war. Hierfür wurden die Intensitäten der monoisotopischen m/z-Werte für jedes markierte Peptid-Paar über den gesamten Elutionsbereich aufgezeichnet und ihre L/H-Verhältnisse nach folgender Formel berechnet:

$$L/H = \frac{\sum MS-Intensitäten [MH + Bio-Cys-d0]^{+}}{\sum MS-Intensitäten [MH + Bio-Cys-d4]^{+}} * Normalisierungsfaktor$$

Normalisierungsfaktor =
$$1/\left(\frac{\sum MS-Intensitäten [MH O-GalNAc-Peptid-Bio-Cys-d0]^+}{\sum MS-Intensitäten [MH O-GalNAc-Peptid-Bio-Cys-d4]^+}\right)$$

Die ermittelten L/H-Verhältnisse der einzelnen markierten Peptid-Paare wurden anschließend auf das L/H-Verhältnis des O-GalNAc-Peptides normalisiert. Vergleicht man die L/H-Verhältnisse der direkt auf die MALDI-Platte aufgetragenen Proben mit denen der über C18-RP-nano-HPLC getrennten, stellt man fest, dass diese identisch sind (Tab. 3-3). Der Isotopen-Effekt hatte demnach keinen Einfluss auf die relative Quantifizierung von Bio-Cys-d0/d4-markierten Peptiden.

3.2.9 β-Eliminierung/Michael Addition-bedingte Bildung von Diastereoisomeren

Betrachtet man die Elutionsprofile für das spezifisch markierte, O-GlcNAc-modifizierte Peptid α -A₁₅₈₋₁₆₃ und das unspezifisch derivatisierte Peptid α -A₅₀₋₅₄, so stellt man fest, dass jeweils das gleiche Peptid in zwei voneinander getrennten *Peaks* eluiert (Abb. 3-13). Hierbei handelt es sich um einen unerwünschten Nebeneffekt der Derivatisierungsreaktion. Die β -Eliminierung des O-GlcNAc-Restes (bzw. H₂O für unspezifische Derivate) führt zur Bildung einer Doppelbindung zwischen dem α - und β -C-Atom der vorher modifizierten AS. Durch den nukleophilen Angriff der Thiol-Gruppe des Derivatisierungsreagenz an das β -C-Atom wird die Kohlenstoff-Doppelbindung geöffnet. Die gleichzeitige Anlagerung eines H-Atoms an das α -C-Atom kann entweder aus *cis*- oder *trans*-Richtung erfolgen (Tinette *et al.* 2007). Hierdurch kommt es zur Bildung von Diastereoisomeren

(Abb. 3-14). Die entstandenen Diastereoisomere unterscheiden sich in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften und lassen sich über Umkehrphasen-Chromatographie voneinander trennen. Dies ist aus zwei Gründen unvorteilhaft. Zum einen nimmt die Proben-Komplexität zu, was die Wahrscheinlichkeit von Signal-Überlagerungen im MS erhöht. Zum anderen kommt es zur Abnahme der Sensitivität, da sich das Peptid auf zwei Signale verteilt.



Abbildung 3-14: Schematische Darstellung der β-Eliminierung/Michael Addition-bedingten Stereoisomerie. Gezeigt ist der Mechanismus der Stereoisomer-Bildung an Ser-O-GlcNAc. Das X steht für Bio-Cys-d0/d4.

Nachweis der O-GlcNAc-Modifizierung an Ser162 von α -Crystallin über relative Quantifizierung nach C18-RP-nano-HPLC mit und ohne Labeltausch

Trotz der unerwünschten Diastereoisomer-Bildung ließ sich die O-GlcNAc-Modifizierung an Ser162 der α -A-Kette nach Analyse der Probe über LC-MALDI-MS an zwei Peptiden (α -A₁₅₈₋₁₆₃ und α -A₁₅₈₋₁₇₃) identifizieren (vgl. Tab. 3-3). Durch die Bio-Cys-d0-Markierung konnte die Modifizierungsposition im MSMS in der y- sowie der b-Ionenreihe eindeutig Ser162 zugeordnet werden (MSMS α -A₁₅₈₋₁₆₃; Abb. 3-15).



Abbildung 3-15: Nachweis der O-GlcNAc-Modifizierung an Ser-162 von α -Crystallin. MALDI-TOF/TOF MSMS des Bio-Cys-d0-markierten Peptides α -A₁₅₈₋₁₆₃ nach C18-RP-nano-HPLC. Annotiert wurden die y-, y*- (y - NH₃) und b-Ionen, interne Fragment-Ionen sowie die Indikator-Ionen bei m/z 304, 328 und das Neutralverlust-Ion bei m/z [M – 303]⁺.
Die aus vier technischen Replikaten gemittelten L/H-Verhältnisse für α -A₁₅₈₋₁₆₃ und α -A₁₅₈₋₁₇₃ betrugen nach der Normalisierung 2,94 und 3,18. Die der unspezifisch derivatisierten Peptide lagen zwischen 0,97 und 1,09 (Tab.3-3).

Mit zunehmender Proben-Komplexität kann es im MS zu Signal-Überlagerungen unterschiedlicher Peptide kommen. Die Wahrscheinlichkeit solch einer Überlagerung wird durch die Entstehung der Diastereoisomere zusätzlich erhöht. Für die relative Quantifizierung könnte solch eine Überlagerung ein falsches L/H-Verhältnis suggerieren und in der Konsequenz zu einer falschpositiven Zuordnung einer O-GlcNAc-Modifizierung führen. Aus diesem Grund wurden zusätzlich zur "normalen" Derivatisierung *Label*tausch-Experimente durchgeführt. Hierbei wurden die glykosylierten Proben mit Bio-Cys-d4 und die deglykosylierten mit Bio-Cys-d0 markiert. Die resultierenden, aus drei Versuchen gemittelten, H/L-Verhältnisse betrugen für das Fragment α -A₁₅₈₋₁₆₃ 2,08 und für das Fragment mit tryptischer Fehlspaltstelle α -A₁₅₈₋₁₇₃ 6,12. Die H/L-Verhältnisse für die unspezifisch markierten Peptide lagen zwischen 0,79 und 1,03 (Tab. 3-3).

Tabelle 3-3: L/H-Verhältnisse tryptischer Bio-Cys-d0/d4-derivatisierter Peptide von α-Crystallin. Vergleich der relativen Quantifizierung vor C18-RP-nano-HPLC (PMF L/H), nach Umkehrphasen-Chromatographie (nano-LC L/H) und des *Label*tauschs nach C18-RP-nano-HPLC (nanoLC H/L *Label*tausch). Rot markierte AS zeigen vorher O-GlcNAc-modifizierte AS, blau markierte zeigen unspezifisch derivatisierte AS.

Theor. <i>m/z</i> Bio-Cys-d0	Kette	Sequenz	PMF L/H	nanoLC L/H*	nanoLC H/L** <i>Label</i> tausch	Mascot score ¹
1617,85	O-GalNAc-Peptid	FVFDRPLPVSR	-	1 ± 0	1 ± 0	
918,44	A ₅₀₋₅₄	Q ^{Pyr} SLFR	1,05	$0,\!99\pm0,\!05$	$0,\!82\pm0,\!005$	19
927,50	A ₁₅₈₋₁₆₃	AIPVSR	2,4	$2,94 \pm 0,97$	$\textbf{2,08} \pm \textbf{0,08}$	25
1157,57	B ₁₅₀₋₁₅₇	KQASGPER	n.d.	$1,\!08\pm0,\!05$	$0,\!97\pm0,\!05$	37
1303,57	A ₁₆₄₋₁₇₃	EEKPSSAPSS	n.d.	$1,\!07\pm0,\!05$	$0,79\pm0,08$	17
1322,65	A ₁₃₋₂₁	TLGPFYPSR	1,03	$1,\!09\pm0,\!05$	$1,03 \pm 0,009$	38
1358,57	A ₁₀₄₋₁₁₂	Q ^{Pyr} DDHGYISR	1,03	$0,97 \pm 0,06$	0,96 ± 0,03	47
1460,73	A ₅₅₋₆₅	TVLD8GISEVR	1,06	$0,\!97\pm0,\!03$	$0,9 \pm 0,02$	67
1926,95	A ₁₅₈₋₁₇₃	AIPVSREEKPSSAPS S	n.d.	3,18 ± 0,1	6,17 ± 0,45	26

* Gemittelte Werte aus vier technischen Replikaten nach Normalisierung mit Standardabweichung

** Gemittelte Werte aus drei technischen Replikaten nach Normalisierung mit Standardabweichung

- In dem jeweiligen Experiment nicht identifizierte Derivate

Pyr Pyroglutamat

Höchster aus allen Messungen ermittelter Mascot score

In allen durchgeführten Experimenten waren die relativen Unterschiede zwischen glykosylierter und deglykosylierter Probe für das Peptid mit tryptischer Fehlspaltstelle α -A₁₅₈₋₁₇₃ größer als für das kurze Peptid α -A₁₅₈₋₁₆₃. Üblicherweise würde man davon ausgehen, dass beide Peptide das gleiche

L/H-Verhältnis zeigen (H/L im Labeltausch-Experiment). Diese Beobachtungen deuten auf eine, durch die O-GlcNAc-Modifizierung hervorgerufene, verminderte tryptische Prozessierung hin. Das O-GlcNAc-modifizierte Ser162 befindet sich in direkter Nachbarschaft zu Arg163. Kommt es in der glykosylierten (-OGA) Probe zu einer verminderten proteolytischen Spaltung an Arg163, würde dies zu einer Akkumulation des langen O-GlcNAc-modifizierten Peptides (α -A₁₅₈₋₁₇₃) führen. In der deglykosylierten (+OGA) Probe ist Arg163 frei zugänglich, wodurch mehr korrekt prozessierte Fragmente (α -A₁₅₈₋₁₆₃) gebildet werden und es zu keiner verstärkten Akkumulation des langen Peptides kommt. Im Endeffekt würde dies zu großen L/H-Verhältnissen (H/L im Labeltausch-Experiment) für das Peptid mit tryptischer Fehlspaltstelle und zu kleinen, für das korrekt prozessierte Peptid führen. Es ist bekannt, dass Arg- und Lys-Reste, die sich in direkter Nähe zu einer phosphorylierten AS befinden, vermindert tryptisch prozessiert werden (Benore-Parsons et al. 1989). Zurückgeführt wird dies auf sterische Hinderungen durch den Phosphat-Rest. N-Acetylglukosamin ist mit 221 Da mehr als doppelt so groß, wie ein Phosphat-Rest. Es ist demnach nachvollziehbar, dass Arg- und Lys-Reste in unmittelbarer Nähe einer O-GlcNAc-modifizierten AS weniger effektiv tryptisch gespalten werden. Die generell geringen L/H- und H/L-Verhältnisse zwischen glykosylierter und deglykosylierter Probe sind durch die geringe Stöchiometrie (2%) der O-GlcNAc-Modifizierung an α-Crystallin zu erklären (Roquemore et al. 1992).

Die O-GlcNAc-Modifizierung an Thr170 der α -B-Kette konnte nicht identifiziert werden. Dies kann mehrere Ursachen haben. Es ist bekannt, dass O-GlcNAc-modifizierte Thr-Reste der β -Eliminierung/Michael Additionsreaktion weniger zugänglich sind als Ser-Reste (Wells *et al.* 2002). Außerdem ist es möglich, dass Thr170 im bovinen α -Crystallin nicht glykosyliert wird. Chalkley und Burlingame war es in ihrer Studie ebenfalls nicht möglich, die O-GlcNAc-Modifizierung an Thr170 nachzuweisen. Über die Bezugsquelle des von ihnen verwendeten α -Crystallins trafen sie keine Aussage (Chalkley und Burlingame 2003). Roquemore *et al.* benutzten für ihre Versuche selbstaufgereinigtes α -Crystallin aus den Augenlinsen von Kaninchen und Rhesusaffen. Hier war es ihnen möglich, die O-GlcNAc-Modifizierung an Thr170 der α -B-Kette zu identifizieren (Roquemore *et al.* 1996). Aufgrund von Spezies-Unterschieden und der dynamischen Natur der O-GlcNAc-Modifizierung ist es sehr wahrscheinlich, dass Thr170 im bovinen α -Crystallin nicht glykosyliert wird und aus diesem Grund in der vorliegenden Arbeit nicht identifiziert werden konnte.

Zusammenfassend kann folgendes festgehalten werden: Trotz eines leichten Isotopen-Effektes, hervorgerufen durch die Deuterium-Markierung im Bio-Cys-d4, und einer unerwünschten Diastereoisomer-Bildung während der Derivatisierung, konnte die O-GlcNAc-Modifizierung an Ser162 der α -A-Kette von α -Crystallin eindeutig nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass es zwingend erforderlich ist, eine relative Quantifizierungsstrategie für den β -Eliminierung/Michael Addition-basierten Nachweis von monomeren N-Acetylglukosamin-Modifizierungen zu verfolgen. Anderenfalls ist es unmöglich, zwischen spezifischen und unspezifischen Derivatisierungsprodukten zu unterschieden. Des Weiteren kann postuliert werden, dass Arg- und Lys-Reste in unmittelbarer Nähe einer O-GlcNAc-modifizierten AS weniger effektiv tryptisch gespalten werden.

3.3 Massenspektrometrische Lokalisierung neuer O-GlcNAc-Positionen an HSP90 und 20S-Proteasomen

Nach der erfolgreichen Anwendung und Etablierung der β -Eliminierung/Michael Addion-basierten relativen Quantifizierungsstrategie mit Bio-Cys-d0/d4 auf das Modellprotein α -Crystallin sollte die Methode auf isoliertes HSP90 und 20S-Proteasomen angewendet werden.

3.3.1 Murines Leber-HSP90

HSP90 ist ein Chaperon, welches flexible dimere Komplexe bildet. Jedes etwa 84 kDa große Monomer besteht aus drei Domänen - einer N-terminalen-ATPase-Domäne, einer M-Domäne, welche vermutlich der Substrat-Bindung dient und einer C-terminalen Dimerisationsdomäne. Es nimmt unter den Chaperonen eine Sonderrolle ein, da es nicht ausschließlich fehlerhafte Proteine vor der Aggregation bewahrt, sondern auch regulatorische Funktionen in der Zelle ausübt. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass es in Proteinen Konformationsänderungen induziert, welche diese aktivieren oder stabilisieren (Wandinger *et al.* 2008). 26S-Proteasomen und HSP90 sind auf funktioneller Ebene eng miteinander verknüpft. Nicht nur, dass HSP90 die Anlagerung des 19S-Regulators an den 20S-Kernkomplex reguliert, es nimmt außerdem eine aktive Rolle in der Generierung bestimmter MHC-Klasse-I Epitope ein. Hierfür bindet es vermutlich, ähnlich wie PA700 und PA28, an die äußeren α -Ringe (α 3-UE), wodurch es im Zytosol gebundene Polypeptide dem proteasomalen Abbau zuführt (Imai *et al.* 2003; Yamano *et al.* 2008). Die Anlagerung von HSP90 hat außerdem Einfluss auf die katalytischen Aktivitäten von 20S-Proteasomen. Den ersten Hinweis hierfür konnten Tsubuki *et al.* beobachten. Sie identifizierten HSP90 als Inhibitor der

ZLLL-MCA-hydrolysierenden Aktivität von 20S-Proteasom-Komplexen, welche aus Rattenhirnen isoliert wurden. Die Interaktion mit HSP90 schien aber keinen Effekt auf die anderen proteolytischen Aktivitäten auszuüben (Tsubuki *et al.* 1994). Im Gegensatz dazu zeigten Eleuteri *et al.*, dass mit ansteigender HSP90-Konzentration ein linearer Anstieg der Trypsin-ähnlichen Aktivität zu verzeichnen war. Conconi *et al.* machten die gleichen Beobachtungen wie Tsubuki *et al.*, konnten aber zusätzlich zeigen, dass HSP90 die tryptischen- und ZLLL-MCA-hydrolysierenden Eigenschaften "aktivierter" 20S-Proteasomen (isolierte 20S-Proteasomen, welche gegen Wasser dialysiert wurden) vor oxidativer Inaktivierung schützt (Conconi *et al.* 1998; Conconi *et al.* 1999; Eleuteri *et al.* 2002). Diese zum Teil widersprüchlichen Daten deuten darauf hin, dass der Einfluss von HSP90 auf das Proteasom-System ein streng regulierter Prozess zu sein scheint.

HSP90 ist stark posttranslational modifiziert. Die bekannten PTMs umfassen S-Nitrosilierungen, Lys-Acetylierungen und Ser/Thr/Tyr-Phosphorylierungen (Garcia-Cardena et al. 1998; Scroggins et al. 2007). Acetylierungen und Phosphorylierungen scheinen Einfluss auf die Interaktion mit Substrat-Proteinen zu haben. So wurde beispielsweise beobachtet, dass HSP90 im hyperacetylierten Zustand nur vermindert mit einigen Substrat-Proteinen interagiert, was deren Aktivierung verhindert und sie vermehrt dem proteasomalen Abbau zuführt (Kovacs et al. 2005). Neben der beeinträchtigten Fähigkeit Protein-Protein-Interaktionen einzugehen, führt die Hyperacetylierung zu einer verminderten ATP-Bindung (Murphy et al. 2005). Obwohl seit mehr als 30 Jahren bekannt ist, dass HSP90 phosphoryliert wird und der Grad der Phosphorylierung unter physiologischen Bedingungen sehr hoch ist, wurden bislang wenige Versuche unternommen, den Einfluss dieser dynamischen, regulatorischen PTM auf die Funktion von HSP90 zu untersuchen (Lees-Miller und Anderson 1989). Es konnte aber gezeigt werden, dass der Grad der Phosphorylierung unter Hitzeschock-Bedingungen ansteigt (Legagneux et al. 1991). Über den Einfluss von O-GlcNAc auf die Funktion von HSP90 ist bislang nichts bekannt. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass es möglich ist, HSP90 mit dem monoklonalen O-GlcNAc-spezifischen AK CTD110.6 aus Rattenhirn-Extrakt zu präzipitieren und dass sich humanes HSP90a über CTD110.6 detektieren lässt (Wells et al. 2002; Wang, Z. et al. 2009).

Aufgrund dieser publizierten Daten war es das Ziel, monomere N-Acetylglukosamin-Modifizierungen an HSP90 mittels der β-Eliminierung/Michael Addition-basierten relativen Quantifizierungsstrategie zu identifizieren.

Für den Nachweis der O-GlcNAc-Modifizierungen an HSP90 wurden fünf unabhängige Derivatisierungsexperimente durchgeführt - drei L/H- und zwei *Label*tausch-Experimente. Die Kriterien, die ein Kandidat erfüllen musste, um als O-GlcNAc-modifiziert zu gelten, waren wie folgt: Die L/H-Verhältnisse (H/L *Label*tausch) mussten in allen Messungen nach der Normalisierung auf die Bio-Cys-d0/d4-Verhältnisse des O-GalNAc-Peptides > 1,5 sein. Nach der Analyse der über LC-MALDI-TOF/TOF MS generierten Daten, konnten mehrere Bio-Cys-d0/d4-derivatisierte HSP90-Peptide identifiziert werden. Insgesamt wurden acht unspezifische Derivate und zwei vorher O-GlcNAc-modifizierte Peptide über die aufgezeichneten MSMS-Spektren identifiziert (Tab. 3-4).

Tabelle 3-4: L/H-Verhältnisse tryptischer Bio-Cys-d0/d4-derivatisierter Peptide von HSP90. Vergleich der relativen Quantifizierung nach C18-RP-nano-HPLC MALDI-TOF/TOF MS ohne (nanoLC L/H) und mit *Label*tausch (nanoLC H/L *Label*tausch). Rot markierte AS zeigen O-GlcNAc-Modifizierungen, blau markierte unspezifisch derivatisierte AS.

	E Euserhuisen). Not markierte rie Zeigen o Gierrice Woamzierungen, ond markierte unspezinisen dertvausierte rie				
Theor. <i>m/z</i> Bio-Cys-	Protein/Peptid	Sequenz	nanoLC L/H*	nanoLC H/L** <i>Label</i> tausch	Mascot score
au					
1617,85	O-GalNAc-Peptid	FVFDRPLPVSR	1	1	
1926,95	O-GlcNAc-Peptid	AIPV S REEKPSSAPSS	$>10 \pm n.d.$	$>10 \pm n.d.$	
958,50	HSP90a ₅₈₇₋₅₉₂	VVVSNR	$1,11 \pm 0,14$	$1,05 \pm 0,02$	25
974,50	$HSP90\beta_{880-885}$	VTISNR	$1,04 \pm 0,24$	$0,79 \pm 0$	29
1015,57	HSP90β ₄₅₁₋₄₅₆ / HSP90α ₄₆₀₋₄₆₅	LSELLR	>10 ± n.d.	>10 ± n.d.	37
1176,53	HSP90 ₆₄₂₉₋₄₃₅	FYEAF <mark>S</mark> K	>10 ± n.d.	>10 ± n.d.	33
1180,52	HSP90a ₄₀₁₋₄₀₇	EM ⁰² LQQSK	$0,94 \pm 0,02$	-	27
1453,66	HSP90a ₅₄₈₋₅₅₇	LGIHEDSQNR	$1,02 \pm 0,03$	$1,08 \pm 0,03$	52
1520,71	HSP90a ₅₀₁₋₅₁₀	DQVANSAFVER	$1,01 \pm 0,04$	$1,12 \pm 0,03$	69
1534,72	HSP90 _{β492-502}	EQVANSAFVER	$0,\!97\pm0,\!02$	$1,05 \pm 0,02$	52
1633,77	HSP90 _{β320-330}	HFSVEGQLEFR	$1 \pm 0,03$	$1,04 \pm 0,08$	17
1798,89	HSP90 ₃₇₉₋₃₉₂	GVVDSEDLPLNISR	$0,99 \pm 0,05$	$1,05 \pm 0,02$	42

* Gemittelte Werte aus drei technischen Replikaten nach Normalisierung mit Standardabweichung

** Gemittelte Werte aus zwei technischen Replikaten nach Normalisierung mit Abweichung

n.d. Nicht ermitteltet Standardabweichung, da L/H- bzw. H/L-Verhältnisse >10 waren

- In dem jeweiligen Experiment nicht identifizierte Derivate

⁰² Zweifach oxidiert

[!] Höchster aus allen Messungen ermittelter Mascot score

Die O-GlcNAc-Modifizierungsstellen wurden eindeutig Ser434 ($_{429}$ FYEAFS(Bio-Cys-d0/d4)K $_{435}$) und Ser452 ($_{451}$ LS(Bio-Cys-d0/d4)ELLR $_{456}$) des konstitutiv exprimierten HSP90 β zugeordnet (Abb. 3-16). Die Datenbank-Analyse ergab für das Peptid LS(Bio-Cys-d0/d4)ELLR eine zusätzliche

Zuordnung zum stressinduzierten HSP90 α . Dies ist auf die große Homologie zwischen HSP90 α und HSP90 β (85,3 %) zurückzuführen. In beiden Isoformen ist dieselbe Peptid-Sequenz vertreten (HSP90 $\alpha_{460-465}$ und HSP90 $\beta_{451-456}$). Es konnten aber auch einige nichthomologe, unspezifisch Bio-Cys-d0/d4-derivatisierte Peptide HSP90 α zugeordnet werden. Demnach liegt die Vermutung nahe, dass die stressinduzierte Form ebenfalls in den aufgereinigten Protein-Proben enthalten war. Für die Isolierung von HSP90 wurden die Lebern von 15 Mäusen homogenisiert. Es ist möglich, dass eine oder mehrere Mäuse vor der Organ-Entnahme, immunologischem oder umweltbedingtem Stress ausgesetzt waren und aus diesem Grund vermehrt HSP90 α bildeten. Aufgrund der Sequenzhomologie zwischen HSP90 α und β ist es sehr wahrscheinlich, dass sowohl Ser461(α), als auch Ser452 (β) Substrate der O-GlcNAc-Transferase darstellen.

Die, im Vergleich zu α -Crystallin sehr hohen L/H- bzw. H/L-Verhältnisse (*Label*tausch) der identifizierten vormals O-glykosylierten Peptide (>10) weisen auf eine ungewöhnlich hohe Stöchiometrie der O-GlcNAc-Modifizierungen an HSP90 hin. Dies korreliert mit den Beobachtungen von Lees-Miller und Anderson. Sie zeigten, dass der Phosphorylierungsgrad von HSP90 sehr hoch ist (Lees-Miller und Anderson 1989). Beide PTMs ähneln sich stark in Bezug auf Dynamik und Stöchiometrie.



Abbildung 3-16: Nachweis der O-GlcNAc-Modifizierung an Ser434 und Ser452 von HSP90 β (Ser461, HSP90 α). MALDI-TOF/TOF MSMS der Bio-Cys-d0-markierten Peptide (A) HSP90 $\beta_{429-435}$ und (B) HSP90 $\beta_{451-456}$ /HSP90 $\alpha_{460-465}$ nach C18-RP-nano-HPLC. Annotiert wurden die y-, y*- (y - NH₃), b- und b*-Ionen (b – NH₃) sowie die Indikator-Ionen bei *m*/*z* 304, 328 und das Neutralverlust-Ion bei *m*/*z* [M - 303]⁺.

Hinweise auf ein verändertes Ionisierungsverhalten von Peptiden mit C-terminaler S(Bio-Cys-d0/d4)K-Sequenz im MSMS

Peptide, deren C-Termini eine S(Bio-Cys-d0/d4)K-Konfiguration aufweisen, zeigen ein verändertes Ionisierungsverhalten im MSMS gegenüber underivatisierten Analoga. Vergleicht man die MSMS-Spektren der Peptide ₄₂₉FYEAFS(Bio-Cys-d0)K₄₃₅ von HSP90 β (Abb. 3-16 A) und ₁₀₈LVS(Bio-Cys-d0)LIGSK₁₁₅ der α 6-UE aus 20S-Proteasomen (Abb. 3-19 E) sieht man deutliche Unterschiede im

Ionisierungsverhalten der y- und b-Ionen. Das Bio-Cys-d0-markierte y2-Ion im HSP90ß-Peptid bildet das abundanteste Signal im Fragment-Spektrum. Mit ansteigender Länge der y-Fragmente nimmt die Intensität der Signale ähnlich einer absteigenden Treppe ab. Die korrespondierenden b-Ionen zeigen durchweg geringe Signal-Intensitäten. Des Weiteren fällt auf, dass die Indikator-Ionen des Bio-Cys-d0-Reagenz im Vergleich zu allen anderen dargestellten Fragment-Spektren schwach ausgeprägt sind. Das exakt gleiche Phänomen zeigte sich im MSMS-Spektrum des unspezifisch derivatisierten Peptides 401 EM^{O2}LQQS(Bio-Cys-d0)K407 von HSP90a (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zum Ionisierungsverhalten hatte die Bio-Cys-d0-Markierung, im Vergleich mit dem underivatisierten Peptid, keinen Einfluss auf das Fragmentierungsverhalten des Peptid-Rückgrades (Daten nicht gezeigt). Die Fragmentierung war demnach unabhängig davon, ob das Serin an y2-Position Bio-Cys-d0-markiert ist oder nicht. Es hat den Anschein, dass positive Ladungen an Fragmenten mit C-terminaler S(Bio-Cys-d0)K-Konfiguration besonders effektiv stabilisiert werden. Für Peptide mit C-terminaler S(Bio-Cys-d0)R-Struktur, konnte kein ähnliches Ionisierungsverhalten beobachtet werden (Abb. 3-15). Diese Daten geben einen weiteren Hinweis die ionisierungsfördernden Eigenschaften der Bio-Cys-d0/d4-Markierung auf gegenüber underivatisierten Peptiden. Um verlässliche Aussagen über das Ionsierungsverhalten Bio-Cys-d0derivatisierter Peptide mit C-terminaler SK-Konfiguration im MSMS treffen zu können, wäre es nötig Experimente mit einer Reihe von synthetischen Peptiden durchzuführen.

Mögliche Auswirkungen der alternativen O-GlcNAc/Phosphat-Modifizierung an Ser452 von HSP90 β

Ser452 von HSP90β kann alternativ auch phosphoryliert werden (Dephoure *et al.* 2008). Eine falsch-positive Zuordnung der O-GlcNAc-Modifizierung kann aus folgenden Gründen ausgeschlossen werden: Die enzymatische Dephosphorylierung wurde in fünf unabhängigen Experimenten durchgeführt. Außerdem konnte keine der anderen bekannten Phosphorylierungsstellen an HSP90 über die Bio-Cys-d0/d4-Derivatisierung identifiziert werden.

Die Phosphorylierung an Ser452 wurde im Rahmen einer massenspektrometrischen Hochdurchsatz-Analyse (>14.000 identifizierte Phosphorylierungen) über das Peptid ₄₅₀RLS(Phos)ELLR₄₅₆ eindeutig HSP90 β zugeordnet (HSP90 α -Sequenz: ₄₅₉KLSELLR₄₆₅). Ziel der Studie war es, Phosphorylierungsunterschiede in Hela-Zellen (humane Krebszelllinie), welche sich in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus befinden, relativ zu quantifizieren (Dephoure *et al.* 2008). Da im Rahmen einer solchen Hochdurchsatz-Analyse nicht jede Phosphorylierungsstelle identifiziert

werden kann, ist es plausibel anzunehmen, dass HSP90 α ebenfalls an der analogen Position Ser461 phosphoryliert vorliegen kann.

Im Fall der O-GlcNAc/Phosphat-Modifizierung an Ser452 von HSP90ß ist demnach ein Ying und Yang-Zusammenhang zwischen beiden PTMs wahrscheinlich. Das heißt, dass beide Modifizierungen einen antagonistischen regulatorischen Effekt ausüben. Über den Einfluss von Phosphorylierungen auf die Chaperon-Funktion von HSP90 ist bislang wenig bekannt. Jedoch konnte, im Rahmen einer Studie an PP5 (Ser/Thr-Protein-Phosphatase 5), gezeigt werden, dass die Bindung von PP5 über dessen N-terminale TPR-Domäne an den C-Terminus von HSP90 eine Aktivierung der Phosphatase-Aktivität bewirkt (Ramsey und Chinkers 2002). PP5 stellt hierbei eine Ausnahme unter den Phosphatasen dar, da sie die einzige ist, die über TPRs mit Substrat-Proteinen interagiert. Aufgrund ihrer geringen basalen Phosphatase-Aktivität wurde sie, verglichen mit anderen Phosphatasen, erst sehr spät entdeckt. Im ungebundenen Zustand interagieren die N-terminalen TPRs mit 13 AS des C-Terminus, wodurch die Phosphatase-Aktivität inhibiert wird (Yang, J. et al. 2005). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen ist, dass PP5 HSP90 nur im komplexierten Zustand dephosphoryliert. Eine Deletion des homologen ppt1-Gens in Hefe hatte negative Einflüsse auf die Maturierung einiger HSP90-Substrate zur Folge (Wandinger et al. 2006). Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass Phosphorylierungen Einfluss auf die Funktion von HSP90 ausüben. Wie PP5 interagiert auch OGT über TPRs mit Substrat-Proteinen. Beide TPR-Domänen ähneln sich stark in Bezug auf ihre Struktur und konservierte AS-Reste (Das et al. 1998; Jinek et al. 2004). Ein TPR setzt sich aus 34 AS, welche zwei antiparallele α -Helices bilden, zusammen. An Position 8, 20 und 27 tragen beide kleine hydrophobe AS und an Position 32 einen konservierten Pro-Rest, sowie mehrere nach außen exponierte Gruppen basischer Aminosäuren. Einzelne TPRs ordnen sich in einer rechtsdrehenden Superhelix an. Die drei TPRs von PP5 bilden dabei eine Mulde, die ideal geeignet ist, um α -Helices von Substrat-Proteinen aufzunehmen. Interaktionen zwischen den exponierten basischen AS-Resten von PP5 mit sauren AS-Resten der Bindungspartner stabilisieren den gebildeten Komplex zusätzlich. Die TPRs von OGT tragen ebenfalls nach außen gerichtete basische AS-Reste (Jinek et al. 2004). Je nach Isoform befinden sich am N-Terminus 2,5 (sOGT), 9,5 (mOGT) oder 12,5 (ncOGT) TPRs (Hannover et al. 2003). HSP90 ist bekannt dafür, TPRs von Substrat-Proteinen oder Interaktionspartnern über C-terminale EEVD-Motive zu binden. All diese Daten lassen den Schluss zu, dass sOGT oder ncOGT während der Glykosylierung transient an den C-Terminus von HSP90 binden.

Unter Berücksichtigung dieser Daten kann eine Hypothese hinsichtlich der biologischen Bedeutung der O-GlcNAc/Phosphat-Modifizierung an Ser452 von HSP90β postuliert werden. Im phosphorylierten Zustand wird die Interaktion von HSP90β mit bestimmten unmaturierten Protein-Substraten inhibiert. Durch die Bindung von PP5 an den C-Terminus von HSP90β kommt es zur Dephosphorylierung an Ser452 der M-Domäne. Um zu vermeiden, dass Kinasen Ser452 erneut phosphorylieren und hierdurch die Interaktion mit Substrat-Proteinen verhindern, bindet OGT über seine TPRs an HSP90β und maskiert Ser452. Durch den angelagerten O-GlcNAc-Rest stellt diese Position nicht länger ein Substrat für Kinasen dar. In diesem Zustand kann HSP90β mit Substrat-Proteinen interagieren und sie in eine reife Konformation überführen. Ist der Vorgang abgeschlossen, kommt es zur Deglykosylierung, wodurch Ser452 wieder als Substrat für Kinasen zur Verfügung steht. Durch Anlagerung eines Phosphat-Restes an Ser452 wird HSP90β in den inaktiven oder interaktionsunfähigen Zustand versetzt (Abb. 3-17).



Abbildung 3-17: Hypothese zum funktionellen Zusammenhang zwischen PP5-vermittelter Dephosphorylierung und OGT-vermittelter Glykosylierung und die Auswirkung auf den Maturierungsprozess von HSP90-Substraten. Im phosphorylierten Zustand wird die Interaktion mit einigen HSP90-Substraten unterbunden. Durch die PP5-vermittelte Dephosphorylierung und anschließende Glykosylierung ist es inaktiven oder entfalteten Proteinen möglich mit HSP90 Komplexe einzugehen, wodurch sie in ihre aktive Form überführt werden. Über die OGA-vermittelte Deglykosylierung steht Ser452 wieder als Substrat für eine noch unbekannte Kinase zur Verfügung. Die anschließende Phosphorylierung an Ser452 überführt HSP90 in einen interaktionsunfähigen Zustand. Bei der unbekannten Kinase handelt es sich vermutlich um Protein Kinase A, da 449RRLSE553 von HSP90β der Konsensus-Sequenz der PKA entspricht.

Die gefundenen O-GlcNAc-Modifizierungen könnten außerdem Einfluss auf das komplexe Zusammenspiel zwischen HSP70 und HSP90 haben. Beide Chaperone arbeiten auf dem Gebiet der Protein-Qualitätskontrolle eng zusammen. Sie interagieren mit fehlgefalteten und nativ gefalteten Substraten, welche Protein-Faltspalten in ihrer Struktur aufweisen. Diese Faltspalten sind notwendig, um Liganden, wie Steroide oder ATP zu binden. Durch die Bildung solcher Lücken werden hydrophobe Sequenz-Motive nach außen präsentiert, welche üblicherweise in der dreidimensionalen Struktur des Proteins eingeschlossen sind. Durch die Exposition der hydrophoben Seitenketten

werden diese Proteine metastabil. Sie neigen verstärkt dazu, weiter zu denaturieren oder Aggregate zu bilden. An diesem Punkt greift die HSP70/HSP90-Chaperon-Maschinerie an. Im ersten Schritt bindet HSP70 ATP-abhängig an das metastabile oder entfaltete Protein und bringt es teilweise in seine native Konformation. Im zweiten Schritt wird das vorgefaltete Substrat-Protein an HSP90 übergeben, wo es ATP-abhängig in seine endgültige native Form überführt wird. Ist es HSP70 nicht möglich, das Protein in seine teilweise native Konformation zu falten, wird es über die E3-Ubiquitin-Ligase CHIP (engl. *carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein*) dem proteasomalen Abbau zugeführt (Pratt und Toft 2003). Es ist nachvollziehbar, dass dieses heikle Gleichgewicht zwischen Reparatur und Abbau in gestressten Organismen (Hitzeschock, immunologischer Stress, Nährstoff-Mangel, etc.) auf die Seite des Abbaus kippt. Dies korreliert mit der Tatsache, dass unterschiedlichste Stress-Stimuli zur Akkumulation von Polyubiquitin-Konjugaten führen.

Guinez *et al.* demonstrierten, dass HSP70 eine Lektin-Aktivität gegenüber O-GlcNAc besitzt (Guinez *et al.* 2004). Es wurde lange Zeit vermutet, dass HSP70 und HSP90 transiente Komplexe bilden können. Diese sind aber nicht stabil genug, um sie mit herkömmlichen biochemischen Methoden nachzuweisen (Pratt und Toft 1997). Durch Kreuzvernetzungsexperimente (engl. *cross linking*) konnte die Existenz eines solchen HSP70/HSP90-Komplexes bewiesen werden (Murphy *et al.* 2001). Die Positionen, über welche die Chaperone aneinander binden, sind unbekannt. Es ist also möglich, dass HSP70 über seine Lektin-Aktivität an die glykosylierte M-Domäne bindet und so Substrat-Proteine an HSP90 übergibt. Solch ein Komplex wäre vermutlich nicht stabil genug, um übliche biochemische Trennverfahren intakt zu überstehen. Umgekehrt würde eine vermehrte stressinduzierte Phosphorylierung den Transport von Substraten zu HSP90 und die Bildung eines HSP70/HSP90-Komplexes unterbinden. HSP70-gebundene Proteine würden so vermehrt dem CHIP-vermittelten proteasomalen Abbau zugeführt werden (Abb. 3-18).



Abbildung 3-18: Hypothese über den Einfluss einer alternativen Phosphat/O-GlcNAc-Modifizierung auf die HSP70/HSP90-Chaperon-Maschinerie. Dargestellt ist die Gleichgewichtsreaktion zwischen der HSP70/HSP90-vermittelten Protein-Faltung oder -Reparatur (A) und dem CHIP-vermittelten Abbau von HSP70-gebundenen Substrat-Proteinen (B). (A) Teilweise entfaltete oder metastabile Substrat-Proteine binden im ersten Faltungsschritt ATP-abhängig an HSP70. HSP70 bindet über seine Lektin-Aktivität am glykosylierten HSP90 und übergibt das vorgefaltete Protein an dieses, wodurch der zweite ATP-abhängige Faltungsprozess initiiert wird und das Substrat-Protein in seine final maturierte Konformation überführt wird. (B) Ist es HSP70 nicht möglich das gebundene Protein im ersten Faltungsschritt in die gewünschte Form zu überführen, bindet die E3-Ubiquitin-Ligase CHIP an HSP70 und rekrutiert ein E2-Ubiquitin-konjugierendes Enzym an den Komplex, wodurch das gebundene Protein polyubiquitiniert und dem proteasomalen Abbau zugeführt wird. Unter Stress-Bedingungen erhöht sich der Phosphorylierungsgrad an HSP90 was zu einer verminderten Interaktion zwischen HSP70 und HSP90 führt. Hierdurch kippt das Gleichgewicht zwischen Chaperon-vermittelter Reparatur und CHIP-vermittelter proteasomaler Degradation auf die Seite des Abbaus.

Im Folgenden wird ein Mechanismus beschrieben, welcher den posttranslationalen Phosphat/O-GlcNAc-Status von HSP90 mit der Protein Kinase A (PKA, engl. cyclic AMP-dependent protein kinase A) vermittelten Aktivierung von 26S-Proteasomen unter Nährstoffmangel-Bedingungen in Verbindung bringen könnte. Die Phosphorylierungsstelle an Ser452 von HSP90ß entspricht zu 84 % (NetPhosK 1.0 Server) der Konsensus-Sequenz Arg-Arg-X-Ser/Thr-Z von Protein Kinase A (X steht hierbei für eine kleine AS und Z für eine große hydrophobe AS). PKA ist ein essenzieller Regulator des Glykogen-, Zucker- und Lipid-Metabolismus. Nährstoffmangel-Bedingungen führen zur Akkumulation von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP, engl. cyclic adenosine monophosphate), was die Aktivierung von PKA bewirkt und die Phosphorylierung der Glutamin:Fruktose-6-Phosphat Amidotransferase (GFAT). GFAT ist das limitierende Enzym der

Hexosamin-Biosynthese und katalysiert die Umwandlung von Fruktose-6-Phosphat in Glukosamin. Die PKA-vermittelte Phosphorylierung von Ser205 an GFAT, führt zur Inhibition ihrer katalytischen Aktivität und zu einer zellweiten O-GlcNAc-Abnahme (Chang et al. 2000). Die PKA-Aktivierung bewirkt zusätzlich einen Anstieg der proteolytischen Aktivitäten in 20S- und 26S-Proteasomen und die Stabilisierung von 26S-Komplexen (Zong et al. 2006; Zhang, F. et al. 2007; Asai et al. 2009), wohingegen erhöhte O-GlcNAc-Konzentrationen allgemein mit einer verminderten proteasomalen Aktivität assoziiert werden (Zhang, F. et al. 2003). Unter Nährstoffmangel-Bedingungen ist der Organismus angewiesen auf eigene Ressourcen zurückzugreifen und vermehrt Proteine zu degradieren. Eine erhöhte PKA-vermittelte Phosphorylierung von HSP90 und der damit verbundene Rückgang der O-GlcNAc-Modifizierung, würde unter diesen Bedingungen das Gleichgewicht zwischen Reparatur und Degradation zugunsten des proteasomalen Abbaus verschieben. Durch die erhöhte Nährstoffmangel-Bedingungen proteasomale Aktivität, könnten verstärkt unter akkumulierende HSP90-Substrate effektiver degradiert, und die Abbau-Produkte dem Zellmetabolismus zugeführt werden. Die Phophat/O-GlcNAc-Modifizierung an Ser452 von HSP90ß könnte demnach ein Nährstoff-Sensor sein, welcher die Chaperon-Aktivität an den metabolischen Status der Zelle anpasst.

Voraussetzung für die Untersuchung der tatsächlichen Bedeutung der mono-Glykosylierungen an HSP90, ist ein besseres Verständnis über den Einfluss, den Phosphorylierungen auf die Funktion von HSP90 ausüben. Bislang ist nicht sicher, welche Kinasen HSP90 phosphorylieren. Eine Ausnahme stellt Casein-Kinase II dar, welche die Region zwischen N- und M-Segment beider HSP90-Isoformen phosphoryliert. In HSP90α sind dies die Positionen Ser231 und Ser263 und in HSP90β die sequenzanalogen Ser-Reste 227 und 255 (Lees-Miller und Anderson 1989).

Zusammenfassend, lässt sich festhalten, dass möglich über die es war, β-Eliminierung/Michael Addition mit Bio-Cys-d0/d4 zwei O-GlcNAc-Modifizierungen an HSP90 zu identifizieren. Die großen L/H-, bzw. H/L-Verhältnisse (>10) lassen auf eine ungewöhnlich hohe Stöchiometrie dieser Modifizierungen schließen und machen eine regulatorische Funktion wahrscheinlich. Für das O-glykosylierte/phosphorylierte Ser452 von HSP90ß konnte ein Ying und Yang-Zusammenhang postuliert, und Hypothesen über mögliche Funktionen der antagonistischen Phosphat/O-GlcNAc-Modifizierung aufgestellt werden.

3.3.2 Murine 20S-Proteasomen aus Milz und Gehirn

Der Nachweis monomerer O-GlcNAc-Modifizierungen an 20S-Proteasomen ist besonders herausfordernd. Ein Beleg hierfür stellen zwei kürzlich erschienene Arbeiten dar, deren Ziel der massenspektrometrische O-GlcNAc-Nachweis an Drosophila melanogaster- und Hefe-Proteasomen war (Kikuchi et al. 2010; Klement et al. 2010). Beide Studien führten zu keinen Identifizierungen von O-GlcNAc-Modifizierungsstellen an 20S-Proteasomen. Es soll aber erwähnt werden, dass bislang davon ausgegangen wird, dass monomere N-Acetylglukosamin-Modifizierungen an Ser- und Thr-Resten in Hefen nicht existieren. Im Rahmen massenspektrometrischer Hochdurchsatz-Analysen, welche im Zusammenhang mit Diabetes und Alzheimer durchgeführt wurden, konnten trotz der hohen Abundanz an Proteasomen [1 % vom Gesamtprotein-Anteil der Zelle (Schubert et al. 2000)] bislang erst zwei O-GlcNAc-Modifizierungen nachgewiesen werden. Eine Position wurde in humanen Erythrozyten an Ser198 der 20S-UE a5 identifiziert, und eine weitere in humanem Gehirn auf den Bereich zwischen Position 219 und 225 der 19S-UE Rpn13 eingeengt (Wang, Z. et al. 2009; Skorobogatko et al. 2010). Zurückzuführen ist dies vermutlich auf die enorme Diversität der Proteasomen in der Zelle. Kloss et al. konnten aus Rattenherzen isolierte 20S-Proteasomen über hydrophobe Wechselwirkung-/Anionenaustausch-Chromatographie 15 gekoppelte in unterschiedliche Subtypen auftrennen (Kloss et al. 2009). In der ersten Dimension ließen sich die 20S-Proteasomen aufgrund unterschiedlicher Hydrophobizitäten grob in konstitutive- und zwei misch-20S-Proteasomen separieren. Jede dieser drei 20S-Proteasom-Populationen teilten sich im anschließenden Anionenaustausch-Chromatographie-Schritt in weitere vier bis sechs Subtypen auf, welche sich hinsichtlich ihrer katalytischen Eigenschaften teilweise stark voneinander unterschieden. Ursachen für die enorme Diversität unter den 20S-Proteasomen innerhalb eines Gewebetypes sind der Einbau alternativer proteolytischer β-UE, die Existenz unterschiedlicher Varianten proteasomaler UE aufgrund von SNPs und unterschiedlich stark ausgeprägten PTMs (Liste bekannter SNPs und PTMs an mammalia-20S-Proteasomen, Tab. 4-1 Anhang). Für die humane α 6-UE konnten Beispielsweise bislang drei Isoformen nachgewiesen werden, wovon eine scheinbar Thymusexklusiv exprimiert wird (Wakamatsu et al. 2007).

Nachweis und Vergleich monomerer N-Acetylglukosamin-Modifizierungen an murinen Milz- und Gehirn-20S-Proteasomen

Die für den O-GlcNAc-Nachweis verwendeten Proteasomen wurden aus je 15 murinen (C57B/6) Milzen und Gehirnen aufgereinigt. Unter Berücksichtigung der großen Diversität und des hohen Molekulargewichts (700 kDa) der 20S-Proteasom-Komplexe wurden in der vorliegenden Arbeit ungewöhnlich große Mengen an Protein eingesetzt - für jeden Versuch 300 µg aufgereinigtes 20S-Proteasom. Während sich die aus Milz isolierten 20S-Proteasomen durch einen hohen Anteil (60 %) an konstitutiv exprimierten immuno-Proteasomen (i20S) auszeichnen, wird davon ausgegangen, dass in Gehirn-Präparationen ausschließlich Standard-20S-Proteasomen vorliegen (Noda *et al.* 2000).

Für den O-GlcNAc-Nachweis an Milz-20S-Proteasomen wurden drei unabhängige Derivatisierungsexperimente durchgeführt (zwei L/H- und ein *Label*tausch-Experiment). Für die Glykosylierungsbestimmung an Gehirn-20S-Proteasom konnte lediglich ein L/H-Experiment angefertigt werden. Die Gründe hierfür lagen in der geringen Ausbeute an 20S-Proteasomen aus einer Gehirn-Präparation und unerwarteten technischen Problemen, die in den Folge-Experimenten während der Deglykosylierung auftraten.

Die Kriterien, welche ein Kandidat erfüllen musste, um als O-GlcNAc-modifiziert zu gelten, waren wie folgt: Die L/H-Verhältnisse (H/L Labeltausch) mussten in allen Messungen nach der Normalisierung auf die Bio-Cys-d0/d4-Verhältnisse des O-GalNAc-Peptides > 1,5 sein. Dies ist sinnvoll, da aufgrund der angesprochenen hohen Diversität unter den 20S-Proteasomen davon auszugehen ist, dass einige O-GlcNAc-Modifizierungen eine Stöchiometrie < 1% aufweisen. Da für Gehirn-20S-Proteasomen lediglich ein Experiment durchgeführt werden konnte, wurden nur Kandidaten als O-GlcNAc-modifiziert betrachtet, die ein L/H-Verhältnis > 2 zeigten oder in Milz identifiziert wurden. Zwei Ausnahmen wurden zugelassen. Die erste stellt die hier vorgestellte O-GlcNAc-Modifizierung an Ser198 der a5-UE in Milz-Proteasomen dar. Im Labeltausch-Experiment betrug das H/L-Verhältnis lediglich 1,29. Da es sich hier aber um eine bereits publizierte Glykosylierungsstelle handelt (Wang, Z. et al. 2009) und das aus zwei Vorversuchen gemittelte L/H-Verhältnis $2,95 \pm 0,71$ betrug, konnte davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um eine tatsächliche O-GlcNAc-Modifizierung handelte. Außerdem waren die H/L-Werte im Labeltausch-Versuch für alle spezifisch markierten Peptid-Paare kleiner, als die L/H-Verhältnisse derselben Peptid-Paare (Tab. 3-5). Zurückzuführen ist dies entweder auf eine, im Vergleich zu den früher angefertigten L/H-Experimenten, verminderte Deglykosylierungseffizienz oder einer teilweisen Hydrolyse der Zucker-Reste, durch zu lange Lagerung der in H₂O gelösten Proteasomen bei 4 °C.

Die zweite Ausnahme stellt die identifizierte Glykosylierung an Ser156 der β5i-UE dar. Im *Label*tausch-Experiment war das derivatisierte Peptid-Paar nicht zu identifizieren. In beiden L/H-Proben lagen die in der Peptid-Kette vorhandenen Met-Reste jeweils im zweifach oxidierten Zustand vor (154LL**S(Bio-Cys-d0/d4)**NM^{O2}M^{O2}LQYR₁₆₃). Es ist möglich, dass die Perameisensäure-Oxidation im *Label*tausch-Experiment nicht effizient war und das Peptid aus diesem Grund in mehreren unterschiedlich oxidierten Versionen vorlag. Die Konsequenz wären enorme Intensitätseinbußen, welche eine Detektion im MALDI-TOF/TOF MS verhindern könnten. Für diese Theorie spricht, dass weder Signale für das nichtoxidierte noch für die vier möglichen Oxidationsprodukte detektiert werden konnten.

Unter Berücksichtigung dieser Kriterien konnten insgesamt acht O-GlcNAc-Modifizierungen identifiziert werden (Tab. 3-5). Über die generierten Fragment-Spektren und die eingeführte Bio-Cys-d0-Markierung war es möglich sieben O-GlcNAc-Modifizierungen in Milz-Proteasomen eindeutig und vier in Gehirn-Proteasomen zu lokalisieren (Abb. 3-19). Drei Glykosylierungspositionen konnten sowohl in Milz und Gehirn (Ser136- α 4; Ser110- α 6; Ser57- β 6), vier weitere ausschließlich in Milz (Ser5-a1; Ser198-a5; Ser85-a6; Ser156-B5i) und eine exklusiv im Gehirn (Ser208-β6) detektiert werden.

Trotz der durchweg hohen Sequenzabdeckung der generierten Fragment-Spektren, waren die Mascot *scores* für einige Peptide sehr niedrig. Der Mascot *score* ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit eines Peptid-Vorschlages. Hochabundante MSMS-Signale, welche keinem Peptid-Fragment zugeordnet werden können, bewirken eine Verschlechterung dieses Wertes. Da die monoisotopischen Massen der Indikator-Ionen (*m*/z 227, 304, 308, 328 und 332) auf eine Ausschluss-Liste gesetzt und somit bei der Berechnung der Wahrscheinlichkeit ignoriert wurden, konnten diese nicht für die teilweise niedrigen Mascot *scores* verantwortlich sein. Die Ursache liegt in den höher-molekularen *Clustern*, die sich in fast jedem Fragment-Spektrum finden (Abb. 3-19). Die Herkunft dieser Kontaminationssignale konnte nicht geklärt werden. Es ist aber wahrscheinlich, dass es sich um Signale der Matrix handelt. Aus diesem Grund wurden alle generierten Fragment-Spektren, Bio-Cys-d0/d4-markierter Peptide zusätzlich manuell ausgewertet und außerdem die C18-RP-nano-HPLC Elutionszeiten für die einzelnen Kandidaten der unterschiedlichen Versuchsreihen untereinander verglichen.



Abbildung 3-19: Nachweis von O-GlcNAc-Modifizierungen an Milz- und Gehirn-20S-Proteasomen über MALDI-TOF/TOF MSMS-Spektren Bio-Cys-d0-markierter Peptide: Dargestellt sind repräsentative Fragment-Spektren der über die L/H- bzw. H/L-Verhältnisse (*Label*tausch) der Bio-Cys-d0/d4-Markierung als O-GlcNAc-modifiziert identifizierten Peptide. Annotiert wurden die y-, y*- (y - NH₃), b- und b*-Ionen (b – NH₃) sowie die Indikator-Ionen bei m/z 304, 328 und das Neutralverlust-Ion bei m/z [M – 303]⁺.

Die aus den monoisotopischen Signal-Intensitäten berechneten Bio-Cys-d0/d4-Verhältnisse lassen für die Mehrzahl der O-GlcNAc-Modifizierungen auf Stöchiometrien, die in etwa mit der von α -Crystallin (< 2%) vergleichbar sind, schließen. Ausnahmen stellen zwei in Milz-Proteasom identifizierte O-GlcNAc-Modifizierungen an Ser85 und Ser110 der α 6-UE dar. In allen Messungen, ausgenommen dem *Label*tausch-Experiment für Ser85, lagen die Bio-Cys-d0/d4-Verhältnisse über

einem Wert von zehn. Dass diese hohen Werte nicht von der Abundanz, sondern von einer verminderten unspezifischen Derivatisierung der deglykosylierten Ser-Reste herrühren, kann ausgeschlossen werden. Nahezu alle markierten Ser-Reste (spezifische, wie auch unspezifische) sind von zwei bis drei unpolaren AS (Gly, Leu, Ile, Val, Ala) flankiert (Tab. 3-5). Ser85 und Ser110 der α 6-UE bilden in diesem Punkt keine Ausnahme und sollten demnach demselben unspezifischen Umsatz unterliegen, wie die anderen Bio-Cys-d0/d4-Derivate

In den verwendeten Protein-Datenbanken (Swissprot, NCBI) ist Position 85 aller drei bekannten Säugetier-Isoformen der α 6-UE mit einem Cystein annotiert. In anderen Spezies, wie *Drosophila melanogaster, Schizosaccharomyces japonicus* und *Laccaria bicolor* befindet sich an derselben Position ein Ser-Rest. Dass es sich hier um eine unspezifische Markierung eines Cysteins handelt, kann aus folgenden Gründen ausgeschlossen werden: Würde es sich um ein unspezifisch markiertes Cystein-Peptid handeln, wäre das Bio-Cys-d0/d4-Verhältnis ~ 1. Beispiele hierfür stellen die sowohl in Milz- als auch in Gehirn-20S-Proteasom unspezifisch Bio-Cys-d0/d4-markierten Cystein-Derivate der α 4- (Cys91), α 6- (Cys92) und β 4-UE (Cys91) dar (Tab. 3-5). Deren verminderte Oxidation und die daraus resultierende Derivatisierung sind vermutlich auf die C- oder N-terminal flankierenden sauren AS (Glu, Asp) zurückzuführen. Dieses Phänomen konnte auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet werden (persönliche Information von Prof. Andreas Tholey, Institut für experimentelle Medizin, Arbeitsgruppe Systematische Proteomforschung, Christian-Albrechts Universität zu Kiel).

Weder an Position 84 noch 86 in α 6 ist eine saure AS lokalisiert, die eine verminderte Oxidation erklären würde, zumal diese in beiden Proben identisch ausgeprägt sein müsste, da die Oxidation der Gesamtprobe den initialen Schritt der vorgestellten Derivatisierungsstrategie darstellt. Es ist wenig wahrscheinlich, dass ein Fehler während der Proben-Vorbereitung aufgetreten ist, da das Experiment dreimal wiederholt wurde. Eine mögliche Peptid-Überlagerung im MS-Spektrum wurde durch das durchgeführte *Label*tausch-Experiment ausgeschlossen. Es ist demnach möglich, dass es sich hier entweder um einen Einzelnukleotid-Polymorphismus, oder eine noch unbekannte Isoform der α 6-UE, welche Möglicherweise nur in Milz exprimiert wird, handelt.

Für die SNP-Theorie spricht, dass in der DNS-Sequenz nur ein Cytosin durch ein Guanin ersetzt werden müsste, um einen Cys/Ser-Austausch auszulösen. Aufgrund der scheinbar hohen Stöchiometrie der O-GlcNAc-Modifizierung an Ser85 und dem nur 25 AS entfernten Ser110 ist die wahrscheinlichere Erklärung aber die Existenz einer eventuell Milz- oder immuno-20S-Proteasom-exklusiven α 6-UE.

Tabelle 3-5: L/H-Verhältnisse tryptischer Bio-Cys-d0/d4-derivatisierter Peptide von murinen 20S-Proteasom aus Milz und Gehirn. Vergleich der relativen Quantifizierung nach C18-RP-nano-HPLC MALDI-TOF/TOF MS von Milz-Proteasomen ohne (L/H Milz), mit *Label*tausch (H/L *Label*tausch Milz) und Gehirn-Proteasomen (L/H Hirn). Rot markierte AS zeigen O-GlcNAc-Modifizierungen, blau markierte unspezifisch derivatisierte AS.

Untereinheit	Theor. <i>m/z</i> Bio- Cys-d0	Sequenz	Milz L/H*	Milz <i>Label</i> tausch H/L**	Hirn L/H**	Mascot score !
O-GalNAc- Peptid	1617,84	FVFDRPLPVSR	1	1	1	
O-GlcNAc- Peptid	1926,95	AIPV S REEKPSSAPSS	$>10 \pm n.d.$	$>10 \pm n.d.$	$>10 \pm n.d.$	
α1 ₄₋₁₁	1081,46	G <mark>S</mark> SAGFDR	$1,73 \pm 0,16$	1,53	1,03	27
α4 ₁₃₁₋₁₃₈	1145,60	RPFGI <mark>S</mark> AL	3,51 ± 0,19	2,52	2,1	20
α5 ₁₉₇₋₂₀₃	1058,61	SSLIILK	$2,95 \pm 0,71$	1,29	0,84	21
a6 ₈₃₋₈₉	1197,57	LL <mark>S</mark> [#] NFM ^{O2} R	>10 ± n.d.	3,3	-	35
a6 ₁₀₈₋₁₁₅	1101,62	LVSLIGSK	>10 ± n.d.	>10 ± n.d.	1,7	16
β5i ₁₅₄₋₁₆₃	1617,73	LLSNM ⁰² M ⁰² LQYR	$1,77\pm0,14$	-	-	52
β6 ₅₆₋₆₃	1174,55	LSEGFSIH	3,69 ± 1,22	2,58	1,85	48
β6 ₂₀₄₋₂₁₂	1292,62	DVFI <mark>S</mark> AAER	$1 \pm 0,04$	0,92	2,54	41
α1 ₃₁₋₄₃	1570,81	AINQGGLTSVAVR	$1,08 \pm 0,03$	1,07	0,75	38
α429-36	1031,52	GSTAVGVR	$1 \pm 0,003$	0,98	0,86	30
α4 ₈₉₋₉₅	1127,52	VECQSHR	$1,33 \pm 0,03$	0,80	0,83	20
a6 ₉₀₋₉₆	1102,47	Q ^{Pyr} ECLDSR	$1,\!08\pm0,\!05$	0,71	0,83	26
a6 ₁₅₈₋₁₆₄	1022,46	AM ⁰² SIGAR	$1,27 \pm 0,06$	1,29	0,93	33
a6 ₂₀₉₋₂₁₇	1171,64	NVSIGIVGK	$0{,}89\pm0{,}16$	0,78	0,87	32
α7 ₃₄₋₄₁	1089,56	SSTAIGIR	$1,12 \pm 0,03$	0,72	0,9	31
α7 ₉₄₋₁₀₀	1137,49	EEASNFR	$1,10 \pm 0,17$	0,81	0,93	22
β1 ₂₀₀₋₂₀₈	1032,53	DGSSGGVIR	-	-	0,82	40
β1i ₄₀₋₄₉	1258,65	VSAGTAVVNR	$1,\!10\pm0,\!06$	0,91	-	66
β2i ₂₂₇₋₂₃₇	1483,75	ALSTPTEPVQR	$0,97 \pm 0,05$	0,88	-	35
β4 ₈₇₋₉₃	1073,53	NLADCLR	$1,20 \pm 0,01$	0,95	0,72	35
β5 ₁₃₃₋₁₄₀	1031,55	ISVAAASK	-	-	0,86	28
β7 ₂₀₂₋₂₁₁	1396,68	Q ^{Pyr} PVLSQTEAR	$0,96\pm0,005$	0,83	1,04	46

* Gemittelte Werte aus zwei technischen Replikaten nach Normalisierung mit Abweichung

** Werte aus einem Versuch nach Normalisierung

n.d. Nicht ermitteltet Standardabweichung, da L/H- bzw. H/L-Verhältnisse >10 waren

- In dem jeweiligen Experiment nicht identifizierte Derivate

⁰² Zweifach oxidiert

Pyr Pyroglutamat

[#] Sequenzkonflikt, in den Datenbanken als Cys aufgeführt

Höchster aus allen Messungen ermittelter Mascot score

Ein weiteres mögliches Szenario stellt die Existenz von Cys-Glykosylierungen dar. Bislang wurden solche GlcNAc-Modifizierungen nicht beschrieben, jedoch ist bekannt, dass Cys-Reste phosphoryliert werden können (Guan und Dixon 1991). Cys-Phosphorylierungen sind extrem selten und über ihre biologische Bedeutung ist nahezu nichts bekannt. Aufgrund der ähnlichen Natur beider PTMs kann die Existenz einer Cys-Glykosylierung nicht ausgeschlossen werden. Die im Rahmen dieser Arbeit generierten experimentellen Daten können eine Cys-GlcNAc-Modifizierung an Position 85 der α 6-UE weder be- noch widerlegen. Da bislang keine Hinweise zur Existenz von Cys-Glykosylierungen vorliegen, im Gegenzug aber in mehreren Studien eine hohe Diversität für die α 6-UE gezeigt werden konnte, wird im Folgenden davon ausgegangen, dass es sich bei der AS an Position 85 der α 6-UE in Milz-20S-Proteasom um ein Serin handelt.

Vermuteter Einfluss der O-GlcNAc-Modifizierungen der α 6-Untereinheit in Milz-20S-Proteasom auf die Interaktion mit Proteasom-Aktivatoren

Es ist denkbar, dass in Milz 20S-Proteasom-Subpopulationen existieren, welche die vermutete alternative α 6-UE inkorporieren um spezielle Funktionen innerhalb der Zelle ausüben zu können. Es existieren Hypothesen bezüglich der Regulation von 20S-Proteasom/19S- und 20S-Proteasom/PA28-Komplexen über alternative O-GlcNAc/Phosphat-Modifizierungen der α -Untereinheiten (Strehl 2006). Diese Hypothesen wurden bislang nicht experimentell bestätigt. Es ist bekannt, dass Phosphorylierungen an Ser243 und Ser250 der α 7-UE und PKA-vermittelte Phosphorylierungen am 19S-Regulator, die Interaktion zwischen 19S und 20S stabilisieren. Die Gabe von INF- γ führte in Zellkultur-Experimenten zur Dephosphorylierung der α 7-UE und einer verstärkten Dissoziation der 19S-20S-19S-Komplexe (Bose *et al.* 2004; Asai *et al.* 2009).

INF- γ bewirkt darüber hinaus die *de novo*-Synthese von immuno-Proteasomen, welche in Milz zu etwa 60 % konstitutiv exprimiert werden. Neben dem 19S-Regulator binden diese den, unter INF- γ ebenfalls verstärkt synthetisierten, Proteasom Aktivator 28. Die Konzentrationen der immunrelevanten PA28 α - und β -UE in Milz unterscheiden sich nicht von denen in anderen nichtlymphatischen Organen, wie Lunge und Leber. Wohingegen für PA28 γ eine hohe basale Konzentration in Milz nachgewiesen werden konnte (Noda *et al.* 2000). Ob sich die Verteilung von 19S-20S-19S, PA28-20S-PA28 oder Hybrid-Komplexen in Milz von denen in anderen Organen unterscheidet, ist nicht bekannt. Es ist aber denkbar, dass in lymphatischen Organen konstitutiv vermehrt PA28-i20S-PA28- oder Hybrid-Komplexe existieren. Da ein direkter Zusammenhang

zwischen der α 7-Phosphorylierung und der Stabilität von 19S-20S-19S-Komplexen nachgewiesen werden konnte, ist ein ähnlicher Zusammenhang zwischen der α 6-Glykosylierung und der Bildung von PA28-i20S-PA28-Komplexen denkbar (Abb. 3-20).



Abbildung 3-20: Hypothese zur Existenz alternativer Proteasom-Komplexe in Milz im Zusammenhang mit α 7-Phosphorylierung und α 6-Glykosylierung. Die Phosphorylierung an Ser243 und Ser250 der α 7-UE stabilisiert 19S-20S-Komplexe. Die alternative O-GlcNAc-Modifizierungen an Ser85 und Ser110 in Milz-20S-Proteasom könnte zu einer bevorzugten Anlagerung alternativer regulatorischer Komplexe, wie PA28 führen [in Übereinstimmung mit den Daten von Bose *et al.* und Strehl (Bose *et al.* 2004; Strehl 2006)].

Die Glykosylierung an Ser85 der α 6-UE scheint essenziell für die an Ser110 zu sein, da Ser110 im konstitutiven Gehirn-20S-Proteasom zwar auch als O-GlcNAc-modifiziert nachgewiesen werden konnte, die aus dem L/H-Verhältnis (1,7 in Gehirn) abgeleitete Stöchiometrie aber weit unter der in Milz-20S-Proteasom liegt (Tab. 3-5). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass der Cys/Ser-Austausch an Position 85 und die resultierende O-GlcNAc-Modifizierung in Milz eine regulatorische Bedeutung hat.

Diskussion zur möglichen Kreuz-Kommunikation zwischen O-GlcNAc- und Protein Kinase Avermittelten Phosphat-Modifizierungen

Über den Einfluss von Phosphorylierungen/Glykosylierungen auf Proteasomen ist allgemein wenig bekannt. Die bislang intensivsten Studien über die Auswirkungen von Phosphat-Modifizierungen auf 20S- und 26S-Proteasomen wurden im Zusammenhang mit der Ser/Thr-Kinase PKA durchgeführt.

Zong *et al.* konnten *in vitro* zeigen, dass PKA mit murinen Herz-20S-Proteasomen stabile Komplexe bildet und die Inkubation mit PKA einen Anstieg der drei proteolytischen Aktivitäten bewirkt. Die Caspase- (β 1) und Chymotrypsin-ähnlichen (β 5) Aktivtäten zeigten hierbei einen zweifachen, und die tryptische (β 2) einen 20 %igen Anstieg. In 2D-Westernblot-Analysen mit einem Ser-Phosphatspezifischen AK beobachteten sie eine PKA-bedingte Signal-Steigerung für α 1, α 2, α 3, α 6 sowie β 2, β 3 und β 7. Die Phosphorylierungszunahme der α 6-UE fiel hierbei am geringsten aus (Zong *et al.* 2006). Kloss *et al.* demonstrierten in ihren Experimenten die niedrig-abundante Existenz von immuno-20S-Proteasomen in Rattenherzen (Kloss *et al.* 2009). Es ist demnach möglich, dass die von Zong *et. al.* beobachtete geringe Zunahme der PKA-vermittelten Phosphorylierung der α 6-UE darauf zurückzuführen ist, dass nur die α 6-UE von i20S-Proteasomen phosphoryliert wurden. Dafür spricht, dass Ser85 der α 6-UE mit 60 %iger Wahrscheinlichkeit ein Substrat für PKA darstellt (NetPhosK 1.0 *Server*). Es müsste aber untersucht werden, ob immuno-Proteasomen in anderen Geweben die für Milz vermutete alternative α 6-UE inkorporieren und ob PKA Position 85 in Milz-20S-Proteasomen phosphoryliert.

Zhang et al. zeigten in vivo, dass die PKA-vermittelte Phosphorylierung von Ser120 der Rpt6-UE des 19S-Regulators zum Anstieg der chymotryptischen und tryptischen Aktivitäten in 26S-Proteasomen führt. Weiterhin demonstrierten sie, dass die O-GlcNAc-Modifizierung an Rpt2 und die damit verbundene Hemmung der chymotryptischen Aktivität über die PKA-vermittelte Aktivierung dominiert. Sie schlussfolgerten daraus, dass die Hemmung von GFAT durch PKA nötig ist, um eine Abnahme der O-GlcNAc-Modifizierung an Rpt2 und damit eine gesteigerte proteolytische Aktivität zu bewirken (Zhang, F. et al. 2007). Eine O-GlcNAc-bedingte Inhibierung der proteolytischen Aktivität konnte bislang nur an 26S- aber nicht an 20S-Proteasomen beobachtet werden (Zhang, F. et al. 2003). In den von Zhang et al. durchgeführten Experimenten wurde OGT an ein Trägermaterial immobilisiert und mit 26S-, bzw. 20S-Proteasomen in Anwesenheit von UDP-GlcNAc inkubiert. Es ist bekannt, dass bestimmte Substrate nur glykosyliert werden können, wenn OGT im Komplex mit Interaktionspartnern vorliegt, welche die Kommunikation mit Substrat-Proteinen ermöglichen. Demnach liegt die Vermutung nahe, dass OGT im unkomplexierten Zustand nur vermindert oder gar nicht zur Interaktion mit 20S-Proteasomen befähigt ist und aus diesem Grund kein Einfluss auf die proteolytischen Aktivitäten an 20S-Proteasomen beobachtet wurde. Die identifizierte O-GlcNAc-Modifizierung an Ser156 von ß5i könnte einen ersten Hinweis auf eine direkte Steuerung einer katalytischen Aktivität über O-GlcNAc geben. Ein interessanter Punkt ist, dass die in ß5i

O-GlcNAc-modifizierte, Sequenz ($_{154}$ LLS(O-GlcNAc)NMMLQYR $_{163}$) fast identisch auch in β 5 vorkommt ($_{152}$ LLANMVYQYK $_{160}$), nur dass hier ein Ala- anstelle eines Ser-Restes lokalisiert ist. Dies könnte eine zusätzliche Regulation von i20S-Proteasomen ermöglichen und die Generierung von MHC-Klasse-I-Epitopen beeinflussen.

PKA-vermittelte Phosphorylierungen scheinen außerdem die Stabilität von 26S-Proteasom-Komplexen zu steuern. Asai *et al.* konnten in nativ-Gel-Experimenten zeigen, dass die Gegenwart von rekombinater PKA zu einer Dosis-abhängigen Zunahme an 26S-Proteasom-Komplexen führt. Die Gabe von PKA-Inhibitor H89 bewirkte eine fast vollständige Dissoziation der 26S-Komplexe (Asai *et al.* 2009). Es werden außerdem mögliche Einflüsse von PKA auf die Assemblierung und molekulare Zusammensetzung von 20S-Proteasomen diskutiert, indem Assemblierungsfaktoren oder 20S-UE selbst während des Zusammenbaus modifiziert werden.

In Kombination mit O-GlcNAc ergeben sich hieraus viele mögliche antagonistische und synergistische Regulationsmechanismen in Bezug auf die Assemblierung, Aktivität, Antigen-Prozessierung, Zusammensetzung und Lokalisierung von Proteasom-Komplexen.

Zusammenfassend lässt sich folgendes festhalten: Über die β-Eliminierung/Michael Addition-basierte relative Quantifizierungsstrategie mit Bio-Cys-d0/d4 war es möglich acht O-GlcNAc-Modifizierungen, von denen sieben erstmals gezeigt werden konnten, zu identifizieren. Beide Gewebe zeigten große qualitative Unterschiede in Bezug auf ihren O-GlcNAc-Modifizierungsstatus. Nur drei der insgesamt acht Glykosylierungspositionen waren in beiden Geweben identisch. Dies zeigt einmal mehr die große Diversität dieser regulatorischen PTM. Die hier präsentierten Daten geben einen ersten Eindruck über die Komplexität und Diversität der O-GlcNAc-Modifizierung an 20S-Proteasomen.

Das Wissen um die konkreten O-GlcNAc-Modifizierungspositionen eröffnet für zukünftige Studien Möglichkeiten, die regulatorischen Einflüsse dieser PTM auf die Funktion von 20S-Proteasomen und HSP90 gezielt zu untersuchen.

4. Literatur

- Akiyama, K., K. Yokota, et al. (1994). "cDNA cloning and interferon gamma down-regulation of proteasomal subunits X and Y." <u>Science</u> **265**(5176): 1231-4.
- Andersson, L. and J. Porath (1986). "Isolation of phosphoproteins by immobilized metal (Fe3+) affinity chromatography." <u>Anal Biochem</u> **154**(1): 250-4.
- Andrali, S. S., M. L. Sampley, et al. (2008). "Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic beta-cells." <u>Biochem J</u> **415**(1): 1-10.
- Arendt, C. S. and M. Hochstrasser (1999). "Eukaryotic 20S proteasome catalytic subunit propeptides prevent active site inactivation by N-terminal acetylation and promote particle assembly." <u>Embo J</u> 18(13): 3575-85.
- Arnold, C. S., G. V. Johnson, et al. (1996). "The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine." J Biol Chem 271(46): 28741-4.
- Asai, M., O. Tsukamoto, et al. (2009). "PKA rapidly enhances proteasome assembly and activity in in vivo canine hearts." J Mol Cell Cardiol **46**(4): 452-62.
- Ball, L. E., M. N. Berkaw, et al. (2006). "Identification of the major site of O-linked beta-Nacetylglucosamine modification in the C terminus of insulin receptor substrate-1." <u>Mol Cell</u> <u>Proteomics</u> 5(2): 313-23.
- Ballif, B. A., G. R. Carey, et al. (2008). "Large-scale identification and evolution indexing of tyrosine phosphorylation sites from murine brain." J Proteome Res 7(1): 311-8.
- Beausoleil, S. A., J. Villen, et al. (2006). "A probability-based approach for high-throughput protein phosphorylation analysis and site localization." <u>Nat Biotechnol</u> **24**(10): 1285-92.
- Beavis, R. C. and J. N. Bridson (1993). "Epitaxial Protein Inclusion in Sinapic Acid Crystals." Journal of Physics D-Applied Physics 26 442-447.
- Belich, M. P., R. J. Glynne, et al. (1994). "Proteasome components with reciprocal expression to that of the MHC-encoded LMP proteins." <u>Curr Biol</u> 4(9): 769-76.
- Benore-Parsons, M., N. G. Seidah, et al. (1989). "Substrate phosphorylation can inhibit proteolysis by trypsin-like enzymes." <u>Arch Biochem Biophys</u> **272**(2): 274-80.
- Bose, S., F. L. Stratford, et al. (2004). "Phosphorylation of 20S proteasome alpha subunit C8 (alpha7) stabilizes the 26S proteasome and plays a role in the regulation of proteasome complexes by gamma-interferon." <u>Biochem J</u> **378**(Pt 1): 177-84.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." <u>Anal Biochem</u> **72**: 248-54.
- Braun, B. C., M. Glickman, et al. (1999). "The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity." <u>Nat Cell Biol</u> 1(4): 221-6.
- Byford, M. F. (1991). "Rapid and selective modification of phosphoserine residues catalysed by Ba2+ ions for their detection during peptide microsequencing." <u>Biochem J</u> 280 (Pt 1): 261-5.
- Carapito, C., C. Klemm, et al. (2009). "Systematic LC-MS analysis of labile post-translational modifications in complex mixtures." J Proteome Res **8**(5): 2608-14.
- Carninci, P., T. Kasukawa, et al. (2005). "The transcriptional landscape of the mammalian genome." <u>Science</u> **309**(5740): 1559-63.
- Chalkley, R. J. and A. L. Burlingame (2003). "Identification of novel sites of O-N-acetylglucosamine modification of serum response factor using quadrupole time-of-flight mass spectrometry." <u>Mol Cell Proteomics</u> 2(3): 182-90.

- Chalkley, R. J., A. Thalhammer, et al. (2009). "Identification of protein O-GlcNAcylation sites using electron transfer dissociation mass spectrometry on native peptides." <u>Proc Natl Acad Sci U S</u> <u>A</u> 106(22): 8894-9.
- Chang, Q., K. Su, et al. (2000). "Phosphorylation of human glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase by cAMP-dependent protein kinase at serine 205 blocks the enzyme activity." J Biol Chem 275(29): 21981-7.
- Choudhary, C., C. Kumar, et al. (2009). "Lysine acetylation targets protein complexes and coregulates major cellular functions." <u>Science</u> **325**(5942): 834-40.
- Claverol, S., O. Burlet-Schiltz, et al. (2002). "Mapping and structural dissection of human 20 S proteasome using proteomic approaches." <u>Mol Cell Proteomics</u> 1(8): 567-78.
- Comer, F. I. and G. W. Hart (2000). "O-Glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate." J Biol Chem 275(38): 29179-82.
- Comer, F. I., K. Vosseller, et al. (2001). "Characterization of a mouse monoclonal antibody specific for O-linked N-acetylglucosamine." <u>Anal Biochem</u> **293**(2): 169-77.
- Comtesse, N., E. Maldener, et al. (2001). "Identification of a nuclear variant of MGEA5, a cytoplasmic hyaluronidase and a beta-N-acetylglucosaminidase." <u>Biochem Biophys Res</u> <u>Commun</u> **283**(3): 634-40.
- Conconi, M., L. Djavadi-Ohaniance, et al. (1999). "Conformational changes in the 20S proteasome upon macromolecular ligand binding analyzed with monoclonal antibodies." <u>Arch Biochem Biophys</u> **362**(2): 325-8.
- Conconi, M., I. Petropoulos, et al. (1998). "Protection from oxidative inactivation of the 20S proteasome by heat-shock protein 90." <u>Biochem J</u> 333 (Pt 2): 407-15.
- Dahlmann, B. (2005). "Proteasomes." Essays Biochem 41: 31-48.
- Dahlmann, B., L. Kuehn, et al. (1985). "Purification and characterization of a multicatalytic highmolecular-mass proteinase from rat skeletal muscle." <u>Biochem J</u> 228(1): 161-70.
- Das, A. K., P. W. Cohen, et al. (1998). "The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions." <u>Embo J</u> 17(5): 1192-9.
- Daub, H., J. V. Olsen, et al. (2008). "Kinase-selective enrichment enables quantitative phosphoproteomics of the kinome across the cell cycle." Mol Cell **31**(3): 438-48.
- DeMartino, G. N., K. Orth, et al. (1991). "The primary structures of four subunits of the human, high-molecular-weight proteinase, macropain (proteasome), are distinct but homologous." <u>Biochim Biophys Acta</u> 1079(1): 29-38.
- Denis, N. J., J. Vasilescu, et al. (2007). "Tryptic digestion of ubiquitin standards reveals an improved strategy for identifying ubiquitinated proteins by mass spectrometry." <u>Proteomics</u> 7(6): 868-74.
- Dentin, R., S. Hedrick, et al. (2008). "Hepatic glucose sensing via the CREB coactivator CRTC2." Science **319**(5868): 1402-5.
- Dephoure, N., C. Zhou, et al. (2008). "A quantitative atlas of mitotic phosphorylation." <u>Proc Natl</u> <u>Acad Sci U S A</u> **105**(31): 10762-7.
- Eleuteri, A. M., M. Cuccioloni, et al. (2002). "Interaction of Hsp90 with 20S proteasome: thermodynamic and kinetic characterization." Proteins **48**(2): 169-77.
- Falkenburg, P. E., C. Haass, et al. (1988). "Drosophila small cytoplasmic 19S ribonucleoprotein is homologous to the rat multicatalytic proteinase." <u>Nature</u> **331**(6152): 190-2.
- Ferrell, K., C. R. Wilkinson, et al. (2000). "Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem." <u>Trends Biochem Sci</u> 25(2): 83-8.

- Fletcher, B. S., C. Dragstedt, et al. (2002). "Functional cloning of SPIN-2, a nuclear anti-apoptotic protein with roles in cell cycle progression." Leukemia **16**(8): 1507-18.
- Fujiwara, T., K. Tanaka, et al. (1989). "Molecular cloning of cDNA for proteasomes (multicatalytic proteinase complexes) from rat liver: primary structure of the largest component (C2)." <u>Biochemistry</u> 28(18): 7332-40.
- Gao, Y., J. Miyazaki, et al. (2003). "The transcription factor PDX-1 is post-translationally modified by O-linked N-acetylglucosamine and this modification is correlated with its DNA binding activity and insulin secretion in min6 beta-cells." <u>Arch Biochem Biophys</u> **415**(2): 155-63.
- Garcia-Cardena, G., R. Fan, et al. (1998). "Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90." <u>Nature</u> **392**(6678): 821-4.
- Gauci, S., A. O. Helbig, et al. (2009). "Lys-N and trypsin cover complementary parts of the phosphoproteome in a refined SCX-based approach." <u>Anal Chem</u> **81**(11): 4493-501.
- Gerhard, D. S., L. Wagner, et al. (2004). "The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA project: the Mammalian Gene Collection (MGC)." <u>Genome Res</u> 14(10B): 2121-7.
- Ghosh, S. and M. Karin (2002). "Missing pieces in the NF-kappaB puzzle." Cell 109 Suppl: S81-96.
- Glickman, M. H., D. M. Rubin, et al. (1998). "The regulatory particle of the Saccharomyces cerevisiae proteasome." <u>Mol Cell Biol</u> **18**(6): 3149-62.
- Golks, A., T. T. Tran, et al. (2007). "Requirement for O-linked N-acetylglucosaminyltransferase in lymphocytes activation." Embo J 26(20): 4368-79.
- Goshe, M. B., T. P. Conrads, et al. (2001). "Phosphoprotein isotope-coded affinity tag approach for isolating and quantitating phosphopeptides in proteome-wide analyses." <u>Anal Chem</u> **73**(11): 2578-86.
- Greis, K. D., B. K. Hayes, et al. (1996). "Selective detection and site-analysis of O-GlcNAcmodified glycopeptides by beta-elimination and tandem electrospray mass spectrometry." <u>Anal Biochem</u> 234(1): 38-49.
- Groettrup, M., S. Standera, et al. (1997). "The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **94**(17): 8970-5.
- Groll, M., M. Bajorek, et al. (2000). "A gated channel into the proteasome core particle." <u>Nat Struct</u> <u>Biol</u> 7(11): 1062-7.
- Groll, M., L. Ditzel, et al. (1997). "Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 A resolution." <u>Nature</u> **386**(6624): 463-71.
- Grziwa, A., W. Baumeister, et al. (1991). "Localization of subunits in proteasomes from Thermoplasma acidophilum by immunoelectron microscopy." <u>FEBS Lett</u> **290**(1-2): 186-90.
- Guan, K. L. and J. E. Dixon (1991). "Evidence for protein-tyrosine-phosphatase catalysis proceeding via a cysteine-phosphate intermediate." J Biol Chem 266(26): 17026-30.
- Guinez, C., J. Lemoine, et al. (2004). "70-kDa-heat shock protein presents an adjustable lectinic activity towards O-linked N-acetylglucosamine." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **319**(1): 21-6.
- Hart, G. W., K. D. Greis, et al. (1995). "O-linked N-acetylglucosamine: the "yin-yang" of Ser/Thr phosphorylation? Nuclear and cytoplasmic glycosylation." Adv Exp Med Biol **376**: 115-23.
- Hart, G. W., M. P. Housley, et al. (2007). "Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins." <u>Nature</u> 446(7139): 1017-22.
- Hedou, J., B. Bastide, et al. (2009). "Mapping of O-linked beta-N-acetylglucosamine modification sites in key contractile proteins of rat skeletal muscle." <u>Proteomics</u> 9(8): 2139-48.
- Heinemeyer, W., M. Fischer, et al. (1997). "The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing." J Biol Chem 272(40): 25200-9.

- Heink, S., D. Ludwig, et al. (2005). "IFN-gamma-induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response." Proc Natl Acad Sci U S A 102(26): 9241-6.
- Hill, C. P., E. I. Masters, et al. (2002). "The 11S regulators of 20S proteasome activity." <u>Curr Top</u> <u>Microbiol Immunol</u> 268: 73-89.
- Hoffert, J. D., T. Pisitkun, et al. (2006). "Quantitative phosphoproteomics of vasopressin-sensitive renal cells: regulation of aquaporin-2 phosphorylation at two sites." <u>Proc Natl Acad Sci U S</u> <u>A</u> 103(18): 7159-64.
- Housley, M. P., J. T. Rodgers, et al. (2008). "O-GlcNAc regulates FoxO activation in response to glucose." J Biol Chem 283(24): 16283-92.
- Housley, M. P., N. D. Udeshi, et al. (2009). "A PGC-1alpha-O-GlcNAc transferase complex regulates FoxO transcription factor activity in response to glucose." J Biol Chem 284(8): 5148-57.
- Imai, J., M. Maruya, et al. (2003). "The molecular chaperone Hsp90 plays a role in the assembly and maintenance of the 26S proteasome." <u>Embo J 22(14)</u>: 3557-67.
- Iyer, S. P. and G. W. Hart (2003). "Roles of the tetratricopeptide repeat domain in O-GlcNAc transferase targeting and protein substrate specificity." J Biol Chem 278(27): 24608-16.
- Jackson, S. P. and R. Tjian (1988). "O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation." <u>Cell</u> **55**(1): 125-33.
- Jaffe, H., Veeranna, et al. (1998). "Characterization of serine and threonine phosphorylation sites in beta-elimination/ethanethiol addition-modified proteins by electrospray tandem mass spectrometry and database searching." <u>Biochemistry</u> **37**(46): 16211-24.
- Jinek, M., J. Rehwinkel, et al. (2004). "The superhelical TPR-repeat domain of O-linked GlcNAc transferase exhibits structural similarities to importin alpha." <u>Nat Struct Mol Biol</u> **11**(10): 1001-7.
- Karas, M., M. Gluckmann, et al. (2000). "Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors." J Mass Spectrom **35**(1): 1-12.
- Karas, M. and F. Hillenkamp (1988). "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons." <u>Anal Chem</u> **60**(20): 2299-301.
- Keller, B. O. and L. Li (2000). "Discerning matrix-cluster peaks in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectra of dilute peptide mixtures." <u>J Am Soc Mass</u> <u>Spectrom</u> 11(1): 88-93.
- Kelly, A., S. H. Powis, et al. (1991). "Second proteasome-related gene in the human MHC class II region." <u>Nature</u> 353(6345): 667-8.
- Khidekel, N., S. B. Ficarro, et al. (2007). "Probing the dynamics of O-GlcNAc glycosylation in the brain using quantitative proteomics." <u>Nat Chem Biol</u> **3**(6): 339-48.
- Kikuchi, J., Y. Iwafune, et al. (2010). "Co- and post-translational modifications of the 26S proteasome in yeast." <u>Proteomics</u>.
- Kimura, Y., Y. Saeki, et al. (2003). "N-Terminal modifications of the 19S regulatory particle subunits of the yeast proteasome." <u>Arch Biochem Biophys</u> **409**(2): 341-8.
- Kimura, Y., M. Takaoka, et al. (2000). "N(alpha)-acetylation and proteolytic activity of the yeast 20 S proteasome." J Biol Chem 275(7): 4635-9.
- Klement, E., Z. Lipinszki, et al. (2010). "Enrichment of O-GlcNAc modified proteins by the periodate oxidation-hydrazide resin capture approach." J Proteome Res 9(5): 2200-6.
- Klemm, C., S. Schroder, et al. (2004). "Derivatization of phosphorylated peptides with S- and Nnucleophiles for enhanced ionization efficiency in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry." <u>Rapid Commun Mass Spectrom</u> 18(22): 2697-705.

- Kloetzel, P. M. (2001). "Antigen processing by the proteasome." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> **2**(3): 179-87.
- Kloss, A., S. Meiners, et al. (2009). "Multiple cardiac proteasome subtypes differ in their susceptibility to proteasome inhibitors." <u>Cardiovasc Res</u> **85**(2): 367-75.
- Kohler, A., P. Cascio, et al. (2001). "The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release." <u>Mol Cell</u> 7(6): 1143-52.
- Kovacs, J. J., P. J. Murphy, et al. (2005). "HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperonedependent activation of glucocorticoid receptor." <u>Mol Cell</u> 18(5): 601-7.
- Kreppel, L. K., M. A. Blomberg, et al. (1997). "Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats." J Biol Chem 272(14): 9308-15.
- Kuckelkorn, U., T. Ruppert, et al. (2002). "Link between organ-specific antigen processing by 20S proteasomes and CD8(+) T cell-mediated autoimmunity." J Exp Med **195**(8): 983-90.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." <u>Nature</u> 227(5259): 680-5.
- Lazarus, B. D., D. C. Love, et al. (2006). "Recombinant O-GlcNAc transferase isoforms: identification of O-GlcNAcase, yes tyrosine kinase, and tau as isoform-specific substrates." <u>Glycobiology</u> **16**(5): 415-21.
- Lecker, S. H., A. L. Goldberg, et al. (2006). "Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states." J Am Soc Nephrol 17(7): 1807-19.
- Lee, L. W., C. R. Moomaw, et al. (1990). "Relationships among the subunits of the high molecular weight proteinase, macropain (proteasome)." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1037**(2): 178-85.
- Lees-Miller, S. P. and C. W. Anderson (1989). "The human double-stranded DNA-activated protein kinase phosphorylates the 90-kDa heat-shock protein, hsp90 alpha at two NH2-terminal threonine residues." J Biol Chem 264(29): 17275-80.
- Legagneux, V., M. Morange, et al. (1991). "Heat shock increases turnover of 90 kDa heat shock protein phosphate groups in HeLa cells." <u>FEBS Lett</u> **291**(2): 359-62.
- Lehman, D. M., D. J. Fu, et al. (2005). "A single nucleotide polymorphism in MGEA5 encoding O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D glucosaminidase is associated with type 2 diabetes in Mexican Americans." Diabetes **54**(4): 1214-21.
- Li, Q. and I. M. Verma (2002). "NF-kappaB regulation in the immune system." <u>Nat Rev Immunol</u> **2**(10): 725-34.
- Li, W., P. S. Backlund, et al. (2003). "Susceptibility of the hydroxyl groups in serine and threonine to beta-elimination/Michael addition under commonly used moderately high-temperature conditions." <u>Anal Biochem</u> 323(1): 94-102.
- Lilley, K. S., M. D. Davison, et al. (1990). "N-terminal sequence similarities between components of the multicatalytic proteinase complex." <u>FEBS Lett</u> **262**(2): 327-9.
- Liu, F., K. Iqbal, et al. (2004). "O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(29): 10804-9.
- Liu, X., W. Huang, et al. (2006). "Interaction between c-Abl and Arg tyrosine kinases and proteasome subunit PSMA7 regulates proteasome degradation." Mol Cell 22(3): 317-27.
- Liu, Z., N. R. Isola, et al. (2003). "Biotin-enhanced fragmentation for direct deoxyribonucleic acid sequencing using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry." <u>Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng)</u> **9**(3): 213-9.
- Love, D. C., J. Kochan, et al. (2003). "Mitochondrial and nucleocytoplasmic targeting of O-linked GlcNAc transferase." J Cell Sci 116(Pt 4): 647-54.

- Lu, H., C. Zong, et al. (2008). "Revealing the dynamics of the 20 S proteasome phosphoproteome: a combined CID and electron transfer dissociation approach." <u>Mol Cell Proteomics</u> 7(11): 2073-89.
- Lubas, W. A., D. W. Frank, et al. (1997). "O-Linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats." J Biol Chem 272(14): 9316-24.
- Lubec and Chen (2006). "Submitted (FEB-2007) to UniProtKB."
- Lubec and Diao (2006). "Submitted (NOV-2006) to UniProtKB."
- Macauley, M. S. and D. J. Vocadlo (2009). "Increasing O-GlcNAc levels: An overview of smallmolecule inhibitors of O-GlcNAcase." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1800**(2): 107-21.
- Maniatis, T. and B. Tasic (2002). "Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans." <u>Nature</u> **418**(6894): 236-43.
- Mayya, V., D. H. Lundgren, et al. (2009). "Quantitative phosphoproteomic analysis of T cell receptor signaling reveals system-wide modulation of protein-protein interactions." <u>Sci</u> <u>Signal</u> **2**(84): ra46.
- McLachlin, D. T. and B. T. Chait (2003). "Improved beta-elimination-based affinity purification strategy for enrichment of phosphopeptides." <u>Anal Chem</u> **75**(24): 6826-36.
- Mechref, Y. and M. V. Novotny (2002). "Structural investigations of glycoconjugates at high sensitivity." <u>Chem Rev</u> 102(2): 321-69.
- Mega, T., Y. Hamazume, et al. (1986). "Studies on the methods for the determination of phosphorylation sites in highly phosphorylated peptides or proteins: phosphorylation sites of hen egg white riboflavin binding protein." J Biochem 100(5): 1109-16.
- Meierhofer, D., X. Wang, et al. (2008). "Quantitative analysis of global ubiquitination in HeLa cells by mass spectrometry." J Proteome Res 7(10): 4566-76.
- Meyer, H. E., E. Hoffmann-Posorske, et al. (1986). "Sequence analysis of phosphoserine-containing peptides. Modification for picomolar sensitivity." <u>FEBS Lett</u> **204**(1): 61-6.
- Molina, H., D. M. Horn, et al. (2007). "Global proteomic profiling of phosphopeptides using electron transfer dissociation tandem mass spectrometry." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **104**(7): 2199-204.
- Murphy, P. J., K. C. Kanelakis, et al. (2001). "Stoichiometry, abundance, and functional significance of the hsp90/hsp70-based multiprotein chaperone machinery in reticulocyte lysate." J Biol Chem 276(32): 30092-8.
- Murphy, P. J., Y. Morishima, et al. (2005). "Regulation of the dynamics of hsp90 action on the glucocorticoid receptor by acetylation/deacetylation of the chaperone." J Biol Chem **280**(40): 33792-9.
- Nandi, D., M. N. Iyer, et al. (1996). "Molecular and serological analysis of polymorphisms in the murine major histocompatibility complex-encoded proteasome subunits, LMP-2 and LMP-7." <u>Exp Clin Immunogenet</u> 13(1): 20-9.
- Nishimura, C., T. Tamura, et al. (1993). "cDNA cloning of rat proteasome subunit RC10-II, assumed to be responsible for trypsin-like catalytic activity." <u>FEBS Lett</u> **336**(3): 462-6.
- Noda, C., N. Tanahashi, et al. (2000). "Tissue distribution of constitutive proteasomes, immunoproteasomes, and PA28 in rats." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> 277(2): 348-54.
- Nothwang, H. G., T. Tamura, et al. (1994). "Sequence analyses and inter-species comparisons of three novel human proteasomal subunits, HsN3, HsC7-I and HsC10-II, confine potential proteolytic active-site residues." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1219**(2): 361-8.
- Nussbaum, A. K., T. P. Dick, et al. (1998). "Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1." Proc Natl Acad Sci U S A 95(21): 12504-9.

- O'Connor, G. M., O. M. Hart, et al. (2006). "Putting the natural killer cell in its place." <u>Immunology</u> **117**(1): 1-10.
- O'Donnell, N., N. E. Zachara, et al. (2004). "Ogt-dependent X-chromosome-linked protein glycosylation is a requisite modification in somatic cell function and embryo viability." <u>Mol</u> <u>Cell Biol</u> **24**(4): 1680-90.
- Oda, Y., T. Nagasu, et al. (2001). "Enrichment analysis of phosphorylated proteins as a tool for probing the phosphoproteome." <u>Nat Biotechnol</u> **19**(4): 379-82.
- Ozcan, S., S. S. Andrali, et al. (2010). "Modulation of transcription factor function by O-GlcNAc modification." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1799**(5-6): 353-64.
- Parker, G. J., K. C. Lund, et al. (2003). "Insulin resistance of glycogen synthase mediated by olinked N-acetylglucosamine." J Biol Chem 278(12): 10022-7.
- Petersen, K. F., R. Hendler, et al. (1998). "13C/31P NMR studies on the mechanism of insulin resistance in obesity." <u>Diabetes</u> 47(3): 381-6.
- Pickart, C. M. (2004). "Back to the future with ubiquitin." <u>Cell</u> 116(2): 181-90.
- Pinkse, M. W., P. M. Uitto, et al. (2004). "Selective isolation at the femtomole level of phosphopeptides from proteolytic digests using 2D-NanoLC-ESI-MS/MS and titanium oxide precolumns." <u>Anal Chem</u> 76(14): 3935-43.
- Plemper, R. K. and D. H. Wolf (1999). "Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease." <u>Trends Biochem Sci</u> 24(7): 266-70.
- Pratt, W. B. and D. O. Toft (1997). "Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones." Endocr Rev 18(3): 306-60.
- Pratt, W. B. and D. O. Toft (2003). "Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery." <u>Exp Biol Med (Maywood)</u> **228**(2): 111-33.
- Ramsey, A. J. and M. Chinkers (2002). "Identification of potential physiological activators of protein phosphatase 5." <u>Biochemistry</u> **41**(17): 5625-32.
- Rao, A., C. Luo, et al. (1997). "Transcription factors of the NFAT family: regulation and function." Annu Rev Immunol 15: 707-47.
- Rechsteiner, M., C. Realini, et al. (2000). "The proteasome activator 11 S REG (PA28) and class I antigen presentation." Biochem J 345 Pt 1: 1-15.
- Rikova, K., A. Guo, et al. (2007). "Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer." <u>Cell</u> **131**(6): 1190-203.
- Rock, K. L., I. A. York, et al. (2002). "Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides." Adv Immunol 80: 1-70.
- Roepstorff, P. and J. Fohlman (1984). "Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides." <u>Biomed Mass Spectrom</u> **11**(11): 601.
- Roquemore, E. P., M. R. Chevrier, et al. (1996). "Dynamic O-GlcNAcylation of the small heat shock protein alpha B-crystallin." <u>Biochemistry</u> **35**(11): 3578-86.
- Roquemore, E. P., A. Dell, et al. (1992). "Vertebrate lens alpha-crystallins are modified by O-linked N-acetylglucosamine." J Biol Chem 267(1): 555-63.
- Rostovtsev, V. V., L. G. Green, et al. (2002). "A stepwise huisgen cycloaddition process: copper(I)catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes." <u>Angew Chem Int Ed Engl</u> **41**(14): 2596-9.
- Rubin, D. M., M. H. Glickman, et al. (1998). "Active site mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome." <u>Embo J</u> **17**(17): 4909-19.
- Rush, J., A. Moritz, et al. (2005). "Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells." <u>Nat Biotechnol</u> 23(1): 94-101.

- Scheler, C., Lamer, S., Pan, Z., Li, X.P., Salnikow, J., Jungblut, P. (1998). "Peptide mass fingerprint sequence coverage from differently stained proteins on two-dimensional electrophoresis patterns by matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry (MALDI-MS)." Electrophoresis. 19(6): 918-27.
- Schmid, H. P., R. Vallon, et al. (1993). "Glycosylation and deglycosylation of proteasomes (prosomes) from calf-liver cells: high abundance of neuraminic acid." <u>Biochimie</u> **75**(10): 905-10.
- Schroder, K., P. J. Hertzog, et al. (2004). "Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions." J Leukoc Biol 75(2): 163-89.
- Schubert, U., L. C. Anton, et al. (2000). "Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes." <u>Nature</u> **404**(6779): 770-4.
- Scroggins, B. T., K. Robzyk, et al. (2007). "An acetylation site in the middle domain of Hsp90 regulates chaperone function." Mol Cell 25(1): 151-9.
- Seifert, U., L. P. Bialy, et al. (2010). "Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress." <u>Cell</u> 142(4): 613-24.
- Shafi, R., S. P. Iyer, et al. (2000). "The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny." <u>Proc Natl Acad Sci U</u> <u>S A</u> 97(11): 5735-9.
- Silva Pereira, I., F. Bey, et al. (1992). "Two mRNAs exist for the Hs PROS-30 gene encoding a component of human prosomes." <u>Gene</u> **120**(2): 235-42.
- Sjoblom, T., S. Jones, et al. (2006). "The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers." <u>Science</u> **314**(5797): 268-74.
- Skorobogatko, Y. V., J. Deuso, et al. (2010). "Human Alzheimer's disease synaptic O-GlcNAc site mapping and iTRAQ expression proteomics with ion trap mass spectrometry." <u>Amino Acids</u>.
- Snow, C. M., A. Senior, et al. (1987). "Monoclonal antibodies identify a group of nuclear pore complex glycoproteins." J Cell Biol 104(5): 1143-56.
- Sohn, K. C., K. Y. Lee, et al. (2004). "OGT functions as a catalytic chaperone under heat stress response: a unique defense role of OGT in hyperthermia." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **322**(3): 1045-51.
- Stohwasser, R., S. Standera, et al. (1997). "Molecular cloning of the mouse proteasome subunits MC14 and MECL-1: reciprocally regulated tissue expression of interferon-gamma-modulated proteasome subunits." <u>Eur J Immunol</u> 27(5): 1182-7.
- Strehl, B. (2006). "Struktur und Funktion des 20S Proteasomen aus Organen Listeria monocytogenes infizierter Mäuse." <u>Dissertation</u>.
- Sumegi, M., E. Hunyadi-Gulyas, et al. (2003). "26S proteasome subunits are O-linked N-acetylglucosamine-modified in Drosophila melanogaster." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **312**(4): 1284-9.
- Sundararajan, T. A., K. S. Kumar, et al. (1958). "Role of cation in the dephosphorylation of phosphoproteins by alkali." <u>Biochim Biophys Acta</u> 28(1): 148-58.
- Syka, J. E., J. J. Coon, et al. (2004). "Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry." Proc Natl Acad Sci U S A 101(26): 9528-33.
- Tanahashi, N., Y. Murakami, et al. (2000). "Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis." J Biol Chem 275(19): 14336-45.
- Teo, C. F., S. Ingale, et al. (2010). "Glycopeptide-specific monoclonal antibodies suggest new roles for O-GlcNAc." <u>Nat Chem Biol</u> 6(5): 338-43.
- Thomson, S., D. F. Balson, et al. (1993). "cDNA cloning of a new type of subunit of mammalian proteasomes." <u>FEBS Lett</u> **322**(2): 135-8.

- Thomson, S. and A. J. Rivett (1996). "Processing of N3, a mammalian proteasome beta-type subunit." <u>Biochem J</u> **315 (Pt 3)**: 733-8.
- Tinette, S., R. Feyereisen, et al. (2007). "Approach to systematic analysis of serine/threonine phosphoproteome using Beta elimination and subsequent side effects: intramolecular linkage and/or racemisation." J Cell Biochem 100(4): 875-82.
- Toleman, C., A. J. Paterson, et al. (2004). "Characterization of the histone acetyltransferase (HAT) domain of a bifunctional protein with activable O-GlcNAcase and HAT activities." J Biol Chem 279(51): 53665-73.
- Torres, C. R. and G. W. Hart (1984). "Topography and polypeptide distribution of terminal Nacetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc." J Biol Chem 259(5): 3308-17.
- Tsubuki, S., Y. Saito, et al. (1994). "Purification and characterization of an endogenous inhibitor specific to the Z-Leu-Leu-MCA degrading activity in proteasome and its identification as heat-shock protein 90." FEBS Lett **344**(2-3): 229-33.
- Verma, R., R. Oania, et al. (2004). "Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system." <u>Cell</u> 118(1): 99-110.
- Vestal, M. L. and J. M. Campbell (2005). "Tandem time-of-flight mass spectrometry." <u>Methods</u> <u>Enzymol</u> 402: 79-108.
- Vosseller, K., K. C. Hansen, et al. (2005). "Quantitative analysis of both protein expression and serine / threonine post-translational modifications through stable isotope labeling with dithiothreitol." Proteomics 5(2): 388-98.
- Vosseller, K., J. C. Trinidad, et al. (2006). "O-linked N-acetylglucosamine proteomics of postsynaptic density preparations using lectin weak affinity chromatography and mass spectrometry." <u>Mol Cell Proteomics</u> 5(5): 923-34.
- Vosseller, K., L. Wells, et al. (2001). "Nucleocytoplasmic O-glycosylation: O-GlcNAc and functional proteomics." <u>Biochimie</u> 83(7): 575-81.
- Vosseller, K., L. Wells, et al. (2002). "Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by O-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in Akt activation in 3T3-L1 adipocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(8): 5313-8.
- Wakamatsu, A., J. Yamamoto, et al. (2007). ""NEDO human cDNA sequencing project focused on splicing variants." Submitted (OCT-2007) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases." <u>Cited</u> <u>for: NUCLEOTIDE SEQUENCE</u>.
- Walsh, C. T., S. Garneau-Tsodikova, et al. (2005). "Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications." <u>Angew Chem Int Ed Engl</u> 44(45): 7342-72.
- Wandinger, S. K., K. Richter, et al. (2008). "The Hsp90 chaperone machinery." J Biol Chem 283(27): 18473-7.
- Wandinger, S. K., M. H. Suhre, et al. (2006). "The phosphatase Ppt1 is a dedicated regulator of the molecular chaperone Hsp90." <u>Embo J</u> 25(2): 367-76.
- Wang, X., C. F. Chen, et al. (2007). "Mass spectrometric characterization of the affinity-purified human 26S proteasome complex." <u>Biochemistry</u> 46(11): 3553-65.
- Wang, Z., K. Park, et al. (2009). "Site-specific GlcNAcylation of human erythrocyte proteins: potential biomarker(s) for diabetes." <u>Diabetes</u> **58**(2): 309-17.
- Wang, Z., N. D. Udeshi, et al. (2010). "Enrichment and site mapping of O-linked Nacetylglucosamine by a combination of chemical/enzymatic tagging, photochemical cleavage, and electron transfer dissociation mass spectrometry." <u>Mol Cell Proteomics</u> 9(1): 153-60.
- Wells, L., L. K. Kreppel, et al. (2004). "O-GlcNAc transferase is in a functional complex with protein phosphatase 1 catalytic subunits." J Biol Chem 279(37): 38466-70.

- Wells, L., K. Vosseller, et al. (2002). "Mapping sites of O-GlcNAc modification using affinity tags for serine and threonine post-translational modifications." <u>Mol Cell Proteomics</u> 1(10): 791-804.
- Whelan, S. A. and G. W. Hart (2003). "Proteomic approaches to analyze the dynamic relationships between nucleocytoplasmic protein glycosylation and phosphorylation." <u>Circ Res</u> **93**(11): 1047-58.
- Whelan, S. A. and G. W. Hart (2006). "Identification of O-GlcNAc sites on proteins." <u>Methods</u> <u>Enzymol</u> **415**: 113-33.
- Whitby, F. G., E. I. Masters, et al. (2000). "Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators." <u>Nature</u> **408**(6808): 115-20.
- Wolf, D. H. and W. Hilt (2004). "The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1695**(1-3): 19-31.
- Yamano, T., S. Mizukami, et al. (2008). "Hsp90-mediated assembly of the 26 S proteasome is involved in major histocompatibility complex class I antigen processing." J Biol Chem 283(42): 28060-5.
- Yang, J., S. M. Roe, et al. (2005). "Molecular basis for TPR domain-mediated regulation of protein phosphatase 5." <u>Embo J</u> 24(1): 1-10.
- Yang, W. H., J. E. Kim, et al. (2006). "Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability." <u>Nat Cell Biol</u> 8(10): 1074-83.
- Yang, X., F. Zhang, et al. (2002). "Recruitment of O-GlcNAc transferase to promoters by corepressor mSin3A: coupling protein O-GlcNAcylation to transcriptional repression." <u>Cell</u> 110(1): 69-80.
- Yuzwa, S. A., M. S. Macauley, et al. (2008). "A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo." <u>Nat Chem Biol</u> 4(8): 483-90.
- Zachara, N. E. and G. W. Hart (2002). "The emerging significance of O-GlcNAc in cellular regulation." <u>Chem Rev</u> 102(2): 431-8.
- Zachara, N. E. and G. W. Hart (2004). "O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1673**(1-2): 13-28.
- Zachara, N. E., N. O'Donnell, et al. (2004). "Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells." J Biol Chem **279**(29): 30133-42.
- Zhan, X. and D. M. Desiderio (2006). "Nitroproteins from a human pituitary adenoma tissue discovered with a nitrotyrosine affinity column and tandem mass spectrometry." <u>Anal Biochem</u> **354**(2): 279-89.
- Zhang, F., Y. Hu, et al. (2007). "Proteasome function is regulated by cyclic AMP-dependent protein kinase through phosphorylation of Rpt6." J Biol Chem 282(31): 22460-71.
- Zhang, F., K. Su, et al. (2003). "O-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome." Cell 115(6): 715-25.
- Zhang, H., X. J. Li, et al. (2003). "Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry." <u>Nat Biotechnol</u> 21(6): 660-6.
- Zhang, Q. H., M. Ye, et al. (2000). "Cloning and functional analysis of cDNAs with open reading frames for 300 previously undefined genes expressed in CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells." <u>Genome Res</u> **10**(10): 1546-60.
- Zhang, R., C. S. Sioma, et al. (2002). "Controlling deuterium isotope effects in comparative proteomics." <u>Anal Chem</u> 74(15): 3662-9.

- Zong, C., A. V. Gomes, et al. (2006). "Regulation of murine cardiac 20S proteasomes: role of associating partners." <u>Circ Res</u> 99(4): 372-80.
- Zubarev, R. A., D. M. Horn, et al. (2000). "Electron capture dissociation for structural characterization of multiply charged protein cations." <u>Anal Chem</u> **72**(3): 563-73.
- Zwickl, P., A. Grziwa, et al. (1992). "Primary structure of the Thermoplasma proteasome and its implications for the structure, function, and evolution of the multicatalytic proteinase." <u>Biochemistry</u> 31(4): 964-72.

Anhang

Anhang

Tabelle 4-1: Auflistung aller bekannten posttranslationalen Modifizierungen, Aminosäure-Austausche und Isoformen an 20S-Proteasomen in *Mus musculus, Rattus norvegicus* und *Homo sapiens*.

UE	Art der Modifizierung	AS-Position	Spezies	Referenz
α1	O-GlcNAc	Ser5	Mus musculus	Overath 2010
	Phosphorylierung	Tyr159	Mus musculus	(Ballif <i>et al.</i> 2008)
	Phosphorylierung	Tyr160	Homo sapiens	(Rikova <i>et al.</i> 2007)
	Ubiqiutinierung	Lys59	Homo sapiens	(Denis et al. 2007)
	P-T Sequenzkonflikt	133	Mus musculus Homo sapiens	(Carninci <i>et al.</i> 2005) (DeMartino <i>et al.</i> 1991)
	A-S SNP	233	Homo sapiens	Uniprot
	N6-Acetyllysin	Lys102, Lys104	Homo sapiens	(Choudhary et al. 2009)
α2	Phosphorylierung	Tyr76, Ser198, Thr204	Mus musculus	$(Lu \ et \ al. \ 2008)$ (Pallif et al. 2008)
	Phosphorylierung	111204	Homo sapiens	(Mayya <i>et al.</i> 2009)
		Ser7, Tyr24, Tyr57,		(Rush et al. 2005)
	L-V natürliche Variante	Tyr76, Tyr98 110	Homo sapiens	(Rikova <i>et al.</i> 2007)
	N-Acetylalanin	A 1o 2	Homo sapiens	(Sjoblom et al. 2006)
	N6-Acetyllysin	Aldz	Homo sapiens	(Gauci et al. 2009)
	Nitriertes Tyrosin	Lys70, Lys171	Homo sapiens	(Choudhary <i>et al.</i> 2009)
		Tyr229	field suprens	(Zhan und Desiderio 2006)
α3	Phosphorylierung	Thr33, Ser75, Ser173	Mus musculus	(Lu et al. 2008)
	Phosphorylierung	Ser13, Ser75	Homo sapiens	(Beausoleil <i>et al.</i> 2006) (Wang X <i>et al.</i> 2007)
	N6-Acetyllysin	Lys127, Lys176, Lys238	Homo sapiens	(Choudhary <i>et al.</i> 2009)
α4	O-GlcNAc	Ser136	Mus musculus	Overath 2010
	Phosphorylierung	Thr97	Mus musculus	$(I \parallel et al 2008)$
	Phosphorylierung	Tyr153	Homo sapiens	(Liu, X. <i>et al.</i> 2006)
	Alternative Sequenz	1-70 fehlen in	Homo sapiens	Uniprot
	A-S Sequenzkonflikt	160	Homo sapiens	(Zhang, Q. H. et al. 2000)
	N-Acetylserin	Ser2	Homo sapiens	(Wang, X. et al. 2007)
	N6-Acetyllysin	Lys227	Homo sapiens	(Choudhary et al. 2009)
α5	O-GlcNAc	Ser198	Homo sapiens	(Wang, Z. et al. 2009)
	O-GlcNAc	Ser198	Mus musculus	Overath 2010
	Phosphorylierung	Ser 134, Thr230	Mus musculus	(Lu et al. 2008)
	Phosphorylierung	Ser16, Thr55, Ser 56	Homo sapiens	(Beausoleil et al. 2006)
				(Dephoure <i>et al.</i> 2008)
				(Daub et al. 2008)

Anhang

	A D Saguanzkonflikt	27	Homo capians	(DeMartino at al. 1991)
	A-D Sequenzkonflikt	27	Homo sapiens	(DeMartino et al. 1991)
	v-L Sequenzkonnikt	184	nomo sapiens	(Demartino et al. 1991)
	N-Acetylmethionin	Metl	Homo sapiens	(Wang, X. et al. 2007)
			Rattus norvegicus	(Fujiwara et al. 1989)
α6	O-GlcNAc	Ser85, Ser110	Mus musculus	Overath 2010
	Phosphorylierung	Ser14	Homo saniens	(Dephoure <i>et al.</i> 2008)
	F J 8	~		(
	Ubiquitinierung	Lys115 Lys208	Homo sanians	(Meierhofer et al. 2008)
	Obiquitinerung	Lys115, Lys208	nomo supiens	(Weienfold <i>et ul.</i> 2008)
	CD TA Community of filet	14.15	<i>T</i>	(Silve Densing of al 1002)
	SP-TA Sequenzkonnikt	14-13	Homo sapiens	(Silva Pereira et al. 1992)
	G-V Sequenzkonflikt	3/	Homo sapiens	(Gerhard <i>et al.</i> 2004)
α7	Phosphorylierung	Ser13, Thr186,	Mus Musculus	(Lu <i>et al.</i> 2008)
		Ser243, Ser250		(Rush et al. 2005)
	Phosphorylierung	Tyr161, Ser243,	Homo sapiens	(Molina et al. 2007)
		Ser250	_	(Claverol et al. 2002)
	Phosphorylierung		Rattus norvegicus	(Hoffert <i>et al.</i> 2006)
	······································	Ser250		(
	N-Acetylserin	501250	Homo saniens	(Clayerol et al. 2002)
	1 V-7 Yeety iser in	Ser?	nomo suprens	(Clavelol et ul. 2002)
	Alternative Seguenz	126 142 fabilt in	II	Liningst
	Alternative Sequenz	136-142 Tenit III	nomo sapiens	Uniprot
		Isoform		
	I-M Sequenzkonflikt	91	Homo sapiens	(Gerhard <i>et al.</i> 2004)
	N6-Acetyllysin	Lys57, Lys110,	Homo sapiens	(Choudhary et al. 2009)
		Lys206, Lys230,		
		Lys238		
β1	Phosphorylierung	Ser157	Mus musculus	(Lu et al. 2008)
	1 2 0			
	P-A SNP	107	Homo sapiens	Uniprot
	~- ~-			
	A-T natürliche Variante	38 89	Mus musculus	Uniprot
	V G Sequenzkonflikt	145	Homo sanians	(Akiyama at al. 1994)
	v-O Sequenzkonnikt	145	nomo supiens	(Akiyama et al. 1994)
	Duenentid	1.24		
	Flopeptid	1-34	16 1	
β2	Phosphorylierung	1hr2/3	Mus msuculus	(Lu <i>et al.</i> 2008)
	Phosphorylierung	Tyr154	Homo sapiens	(Rush <i>et al.</i> 2005)
	L-F Sequenzkonflikt	108	Mus musculus	(Carninci et al. 2005)
	K-E Sequenzkonflikt	237	Mus musculus	(Carninci et al. 2005)
	Propeptid	1-43		
β3	N-Acetylserin	Ser2	Homo sapiens	(Wang, X. et al. 2007)
	, j		Rattus norvegicus	(Lubec und Chen 2006)
	M-L SNP	34	Homo saniens	(Nothwang $et al. 1994$)
			110mo suprens	(110 mm ung ci ul. 1997)
	N-6-Acetyllysin	77	Homo saniens	(Choudhary et al. 2009)
R 4	Dhosphorylionur~	Sor20	Mus mussul	(Lu at al 2009)
P4	rnosphorynerung	50139	wius musculus	(Lu ei al. 2008)
	NT A set local to the	Mat		$(\mathbf{W}_{1}, \mathbf{W}_{2}, \mathbf{W}_{2})$
	N-AcetyImethionin	Metl	Homo sapiens	(wang, X. et al. 2007)
	R-L Sequenzkonflikt	70	Rattus norvegicus	(Nishimura et al. 1993)
	A-V Sequenzkonflikt	81	Rattus norvegicus	(Nishimura et al. 1993)
	C-P Sequenzkonflikt	90	Rattus norvegicus	(Nishimura et al. 1993)

Anhang

	N6 A actullusin	Lya69 Lya165	Homo caniona	(Choudhamy at al. 2000)
85	Dhoenhorylionung	Lys08, Lys103	Homo sapiens	(Choudhary et al. 2009)
po	Phosphorynerung	111148	mus musculus	(Lu el al. 2008)
	I-F Sequenzkonflikt	85	Homo sapiens	(Lee <i>et al.</i> 1990)
	A-G Sequenzkonflikt	109	Homo sapiens	(Belich <i>et al.</i> 1994)
	T-S Sequenzkonflikt	185	Homo sapiens	(Belich <i>et al.</i> 1994)
	D-N Sequenzkonflikt	110	Mus musculus	(Carninci <i>et al.</i> 2005)
	S-N Sequenzkonflikt	248	Mus musculus	(Gerhard <i>et al.</i> 2004)
	T-I Sequenzkonflikt	62	Rattus norvegicus	(Lillev <i>et al.</i> 1990)
	H-E Sequenzkonflikt	69	Rattus norvegicus	(Lilley et al. 1990)
	V-L Sequenzkonflikt	73	Rattus norvegicus	(Lilley et al. 1990)
	P-A Sequenzkonflikt	83	Rattus norvegicus	(Lilley et al. 1990)
	I.		0	
	Propeptid	1-59		
β6	O-GlcNAc	Ser57	Mus musculus	Overath 2010
	Phosphorylierung	Tyr149, Ser167	Mus musculus	(Lu et al. 2008)
				(Ballif <i>et al.</i> 2008)
	P-A SNP	11	Homo sapiens	(Gerhard et al. 2004)
	I-N SNP	208	Homo sapiens	Uniprot
		201		
	N-6-Acetyllysin	204	Homo sapiens	(Choudhary <i>et al.</i> 2009)
	Propertid	1.28		
87	Phosphoryliorung	1-28 Sor02	Mus musculus	(Iu at al 2008)
Р/	Phosphorylierung	50195 Tyr102	Homo sapians	(Lu $el al. 2008)$ (Rush $at al. 2005$)
	T nosphorynerung	1 91102	110mo supiens	(Rush et ul. 2005)
	M-I SNP	95	Homo sapiens	Uniprot
	I-T SNP	234	Homo sapiens	(Nothwang <i>et al.</i> 1994)
			· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	(
	E-D Sequenzkonflikt	264	Homo sapiens	(Ebert et al. 2004)
	A-S Sequenzkonflikt	26	Mus muscullus	(Carninci et al. 2005)
	T-A Sequenzkonflikt	27	Mus muscullus	(Gerhard et al. 2004)
	P-H Sequenzkonflikt	42	Mus muscullus	(Carninci et al. 2005)
	E-G Sequenzkonflikt	215	Mus muscullus	(Carninci et al. 2005)
	R-K Sequenzkonflikt	224	Mus muscullus	(Carninci et al. 2005)
	I-V Sequenzkonflikt	234	Mus muscullus	(Carninci et al. 2005)
	P-S Sequenzkonflikt	41	Rattus norvegicus	(Thomson <i>et al.</i> 1993)
	V-L Sequenzkonflikt	50	Rattus norvegicus	(Thomson <i>et al.</i> 1993)
	F-S Sequenzkonflikt	60	Rattus norvegicus	(Thomson und Rivett 1996)
	F-L Sequenzkonflikt	80	Rattus norvegicus	(Thomson und Rivett 1996)
	N-I Sequenzkonflikt	82	Rattus norvegicus	(Thomson <i>et al.</i> 1993)
	I-F Sequenzkonflikt	86	Rattus norvegicus	(Thomson und Rivett 1996)
	V-L Sequenzkonflikt	89	Rattus norvegicus	(Thomson und Rivett 1996)
	F-L Sequenzkonflikt	121	Rattus norvegicus	(Lubec und Diao 2006)
	Propentid	1.45		
Q1:	V I SND	22	Homo sanians	UniProt
pii	R-H SNP	60	Homo sapiens	(Kelly et al. 1991)
	R-C SNP	173	Homo sapiens	UniProt
	R-H natürliche Variante	60 LMP-2h	Mus musculus	UniProt
	R-C natürliche Variante	122 LMP2-b	Mus musculus	UniProt
	N-D natürliche Variante	176 LMP2-b. LMP2-	Mus musculus	UniProt
		b		
	N-6-Acetyllysin		Homo sapiens	(Choudhary et al. 2009)
	Propeptid	Lys53, Lys 109 1-20		
-----	-------------------------	------------------------	--------------	--------------------------
β2ί	A-L Sequenzkonflikt	189	Mus musculus	(Stohwasser et al. 1997)
	Propeptid	1-39		
β5i	O-GlcNAc	Ser156	Mus musculus	Overath 2010
	T-S SNP	74	Homo Sapiens	UniProt
	G-R natürliche Variante	272	Mus musculus	(Nandi et al. 1996)
	A-S natürliche Variante	275	Mus musculus	(Nandi et al. 1996)
	V-M Sequenzkonflikt	148	Mus musculus	(Carninci et al. 2005)
	S-P Sequenzkonflikt	199	Mus musculus	(Gerhard et al. 2004)
	Propeptid	1-72		

Sequenzen analysierter Proteine (Sequenzen aus http://www.uniprot.org/)

Rot markierte AS bezeichnen Phosphorylierungen. Grün markierte AS bezeichnen O-GlcNAc-Modifizierungen. Blau markierte AS bezeichnen alternative Phosphorylierungen/O-GlcNAc-Modifizierungen. Für PTMs an proteasomalen UE siehe Zusammenfassung in Tabelle 4-1.

α-Crystallin A-Kette Rind P02470 (CRYAA_BOVIN) 19.8 kDa

10	20	30	40	50	60
		9 C			
MDIAIQHPWF.	KR <u>T</u> LGPFYPS	RLFDQFFGEG	ГЪ.ЕЛОГГЬЪ.Г	SSTI <mark>S</mark> PYYRQ	STEKLARDSC
7 0	8 0	9 0	10 0	110	120
ISEVRSDRDK	FVIFLDVKHF	SPEDLTVKVQ	EDFVEIHGKH	NERQDDHGYI	SREFHRRYRL
130	140	15 0	16 0	17 0	
P <mark>S</mark> NVDQSALS	CSLSADGMLT	FSGPKIPSGV	DAGHSERAIP	VSREEKPSSA	PSS

α-Crystallin B-Kette Rind P02510 (CRYAB_BOVIN) 20 kDa

10	2 0	30	40	5 0	6 0
MDIAIHHPWI	RRPFFPFH <mark>S</mark> P	SRLFDQFFGE	HLLESDLFPA	ST <mark>S</mark> L <mark>S</mark> PFYLR	PP <mark>S</mark> FLRAP <mark>S</mark> W
70	80	90	100	110	120
IDTGLSEMRL	EKDRF <mark>S</mark> VNLD	VKHFSPEELK	VKVLGDVIEV	HGKHEERQDE	HGFISREFHR
130	140	15 0	16 0	17 0	
KYRIPADVDP	LAITSSLSSD	GVLTVNGPRK	QASGPERTIP	ITREEKPAVT	AAPKK

HSP90a Maus Proteinsequenz P07901 (HS90A_MOUSE) 84.8 kDa

10	20	30	40	5 0	6 0
MPEE <mark>T</mark> QTQDQ	PMEEEEVETF	AFQAEIAQLM	SLIINTFYSN	KEIFLRELIS	NSSDALDKIR
70	80	9 0	10 0	110	120
YESLTDPSKL	DSGKELHINL	IPSKQDRTLT	IVDTGIGMTK	ADLINNLGTI	AKSGTKAFME
130	140	15 0	16 0	17 0	180
ALQAGADISM	IGQFGVGFYS	AYLVAEKVTV	ITKHNDDEQY	AWESSAGGSF	TVRTDTGEPM
19 0	20 0	21 0	22 0	23 0	24 0
GRGTKVILHL	KEDQTEYLEE	RRIKEIVKKH	SQFIGYPITL	FVEKERDKEV	<u>S</u> DDEAEEKEE
25 0	26 0	27 0	28 0	29 0	30 0
KEEEKEKEEK	E <mark>S</mark> DDKPEIED	VGSDEEEEEK	KDGDKKKKKK	IKEKYIDQEE	LNKTKPIWTR
310	32 0	33 0	340	35 0	36 0
NPDDITNEEY	GEF <mark>Y</mark> KSLTND	WEEHLAVKHF	SVEGQLEFRA	LLFVPRRAPF	DLFENRKKKN
37 0	38 0	39 0	40 0	410	42 0
NIKLYVRRVF	IMDNCEELIP	EYLNFIRGVV	DSEDLPLNI <mark>S</mark>	REMLQQSKIL	KVIRKNLVKK
430	440	45 0	46 0	47 0	48 0
CLELFTELAE	DKENYKKFYE	QFSKNIKLGI	HEDSQNRKKL	SELLRYYTSA	SGDEMVSLKD
49 0	50 0	51 0	52 0	53 0	54 0
YCTRMKENQK	HI <u>Y</u> FITGETK	DQVANSAFVE	RLRKHGLEVI	YMIEPIDEYC	VQQLKEFEGK
55 0	56 0	57 0	58 0	59 0	60 0
TLVSVTKEGL	ELPEDEEEKK	KQEEKKTKFE	NLCKIMKDIL	EKKVEKVVVS	NRLVTSPCCI
61 0	62 0	63 0	64 0	65 0	66 0
VTSTYGWTAN	MERIMKAQAL	RDNSTMGYMA	AKKHLEINPD	HSIIETLRQK	AEADKNDKSV
67 0	68 0	69 0	70 0	71 0	72 0
KDLVILLYET	ALLSSGFSLE	DPQTHANRIY	RMIKLGLGID	EDDPTVDDTS	AAVTEEMPPL
73 0					
EGDDDTSRME	EVD				

HSP90β Maus Proteinsequenz P11499 (HS90B_MOUSE) 83.3 kDa

10	20	30	40	5 0	6 0
MPEEVHHGEE	EVETFAFQAE	IAQLMSLIIN	TFYSNKEIFL	RELISNASDA	LDKIRYESLT
7 0	80	9 0	10 0	110	120
DPSKLDSGKE	LKIDILPNPQ	ERTLTLVDTG	IGMTKADLIN	NLGTIAKSGT	KAFMEALQAG
130	140	15 0	16 0	17 0	180
ADISMIGQFG	VGFYSAYLVA	EKVVVITKHN	DDEQYAWESS	AGGSFTVRAD	HGEPIGRGTK
19 0	20 0	21 0	22 0	23 0	240
VILHLKEDQT	EYLEERRVKE	VVKKHSQFIG	YPITLYLEKE	REKEI <mark>S</mark> DDEA	EEEKGEKEEE
25 0	26 0	27 0	28 0	29 0	30 0
DKEDEEKPKI	EDVG <mark>S</mark> DEEDD	SGKDKKKKTK	KIKEKYIDQE	ELNKTKPIWT	RNPDDI <mark>T</mark> QEE
310	32 0	33 0	340	35 0	36 0
YGEF <mark>Y</mark> K <mark>S</mark> LTN	DWEDHLAVKH	FSVEGQLEFR	AFLFIPRRAP	FDLFENKKKK	NNIKLYVRRV
37 0	38 0	39 0	40 0	410	42 0
FIMDSCDELI	PEYLNFIRGV	VDSEDLPLNI	SREMLQQSKI	LKVIRKNIVK	KCLELFSELA
430	440	45 0	46 0	47 0	480
EDKENYKKFY	EAFSKNLKLG	IHEDSTNRRR	LSELLRYHTS	QSGDEMTSLS	EYVSRMKETQ
49 0	50 0	51 0	52 0	53 0	54 0
KSI <mark>Y</mark> YITGES	KEQVANPAFV	ERVRKRGFEV	VYMTEPIDEY	CVQQLKEFDG	K <mark>S</mark> LVSVTKEG
55 0	56 0	57 0	58 0	59 0	60 0
LELPEDEEEK	KKMEESKAKF	ENLCKLMKEI	LDKKVEKVTI	SNRLVSSPCC	IVTSTYGWTA
61 0	62 0	63 0	64 0	65 0	66 0
NMERIMKAQA	LRDNSTMGYM	MAKKHLEINP	DHPIVETLRQ	KAEADKNDKA	VKDLVVLLFE
67 0	68 0	69 0	70 0	71 0	72 0
TALLSSGFSL	EDPQTHSNRI	YRMIKLGLGI	DEDEVTAEEP	SAAVPDEIPP	LEGDEDA <mark>S</mark> RM

EEVD

a1-UE 20S-Proteasom Maus Q9QUM9 (PSA6_MOUSE) 27.3 kDa

0 0 MSRGSSAGFD RHITIFSPEG RLYQVEYAFK AINQGGLTSV AVRGKDCAVI VTQKKVPDKL **0 0** LDSSTVTHLF KITESIGCVM TGMTADSRSQ VQRARYEAAN WKYKYGYEIP VDMLCKRIAD **0 0 0 0** ISQVYTQNAE MRPLGCCMIL IGIDEEQGPQ VYKCDPAGYY CGFKATAAGV KQTESTSFLE **0 0 0 0 0 0** KKVKKKFDWT FEQTVETAIT CLSTVLSIDF KPSEIEVGVV TVENPKFRIL TEAEIDAHLV

ALAERD

α2-UE 20S-Proteasom Maus P49722 (PSA2 MOUSE) 26 kDa

10	2 0	30	40	5 0	6 0
MAKRGYSFSL	TTFSPSGKLV	QIEYALAAVA	GGAPSVGIKA	ANGVVLATEK	KQKSILYDER
70	80	9 0	10 0	110	120
SVHKVEPITK	HIGLVYSGMG	PDYRVLVHRA	RKLAQQYYLV	YQEPIPTAQL	VQRVASVMQE
130	140	15 0	16 0	170	180
YTQSGGVRPF	GVSLLICGWN	EGRPYLFQSD	PSGAYFAWKA	TAMGKNYVNG	KTFLEKRYNE
19 0	20 0	21 0	22 0	23 0	
DLELEDAIHT	AILTLKESFE	GQMTEDNIEV	GICNEAGFRR	LTPTEVRDYL	AAIA

α3-UE 20S-Proteasom Maus Q9R1P0 (PSA4_MOUSE) 29.5 kDa

6 0	5 0	40	30	20	10
NIHKLLDEVF	DGVLLAAERR	AGTCLGILAN	VEYAMEAIGH	IFSPEGRLYQ	MSRRYDSRTT
120	110	10 0	9 0	80	70
VTALCDIKQA	YQEPIPCEQL	RLIAQRYLLQ	SDANVLTNEL	DMACSVAGIT	FSEKIYKLNE
180	17 0	16 0	15 0	140	130
AVSMLKQDYK	ATCIGNNSAA	DPSGNYGGWK	KHYGFQLYQS	GVSLLYIGWD	YTQFGGKRPF
24 0	23 0	22 0	21 0	20 0	19 0
KEVEQLIKKH	GKTVIRVLKQ	VEIATLTRES	MDVSKLSAEK	ALAVKVLNKT	EGEMTLKSAL
				26 0	25 0
			K	KKEKEQREKD	EEEEAKAERE

α4-UE 20S-Proteasom Maus Q9Z2U0 (PSA7_MOUSE) 27.8 kDa

10	2 0	30	40	5 0	6 0
MSYDRAITVF	SPDGHLFQVE	YAQEAVKKGS	TAVGVRGKDI	VVLGVEKKSV	AKLQDERTVR
7 0	8 0	9 0	10 0	110	120
KICALDDNVC	MAFAGLTADA	RIVINRARVE	CQSHRLTVED	PVTVEYITRY	IASLKQRYTQ
13 0	140	15 0	16 0	17 0	180
SNGRRPFGIS	ALIVGFDFDG	TPRLYQTDPS	GTYHAWKANA	IGRGAKSVRE	FLEKNYTDDA
19 0	20 0	21 0	22 0	23 0	240
IETDDLTIKL	VIKALLEVVQ	SGGKNIELAV	MRRDQPLKIL	NPEEIEKYVA	EIEKEKEENE

KKKQKKAS

α5-UE 20S-Proteasom Maus Q9Z2U1 (PSA5 MOUSE) 26.4 kDa

0 MFLTRSEYDR GVNTFSPEGR LFQVEYAIEA IKLGSTAIGI QTSEGVCLAV EKRITSPLME **0 0** PSSIEKIVEI DAHIGCAMSG LIADAKTLID KARVETQNHW FTYNETMTVE SVTQAVSNLA **0** 140 150 **0 0** LQFGEEDADP GAMSRPFGVA LLFGGVDEKG PQLFHMDPSG TFVQCDARAI GSASEGAQSS **0 0 0 0** LQEVYHKSMT LKEAIKSSLI ILKQVMEEKL NATNIELATV QPGQNFHMFT KEELEEVIKD Ι

α6-UE 20S-Proteasom Maus Q9R1P4 (PSA1 MOUSE) 29.5 kDa

0 MFRNOYDNDV TVWSPOGRIH OIEYAMEAVK OGSATVGLKS KTHAVLVALK RAOSELAAHO **0** 10**0** 11**0 0** KKILHVDNHI GISIAGLTAD ARLLCNFMRQ ECLDSRFVFD RPLPVSRLVS LIGSKTQIPT 130 140 150 160 **0** QRYGRRPYGV GLLIAGYDDM GPHIFQTCPS ANYFDCRAMS IGARSQSART YLERHMSEFM **0** 20**0** 21**0** 22**0** ECNLDELVKH GLRALRETLP AEQDLTTKNV SIGIVGKDLE FTIYDDDDVS PFLDGLEERP **0 0** ORKAOPSQAA EEPAEKADEP MEH

α7-UE 20S-Proteasom Maus O70435 (PSA3 MOUSE) 28.4 kDa

0 0 MSSIGTGYDL SASTFSPDGR VFQVEYAMKA VENSSTAIGI RCKDGVVFGV EKLVLSKLYE **0 0** EGSNKRLFNV DRHVGMAVAG LLADARSLAD IAREEASNFR SNFGYNIPLK HLADRVAMYV **0 0 0 0** HAYTLYSAVR PFGCSFMLGS YSANDGAQLY MIDPSGVSYG YWGCAIGKAR QAAKTEIEKL **0** 200 210 QMKEMTCRDV VKEVAKIIYI VHDEVKDKAF ELELSWVGEL TKGRHEIVPK DIREEAEKYA KESLKEEDES DDDNM

β1-UE 20S-Proteasom Maus Q60692 (PSB6 MOUSE) 25.3 kDa (plus Propeptid)

10	20	30	40	5 0	6 0
MAAALAVRRA	GSAPAFGPEA	LTPDWENREV	STGTTIMAVQ	FNGGVVLGAD	SRTTTGSYIA
7 0	80	9 0	10 0	110	120
NRVTDKLTPI	HDHIFCCRSG	SAADTQAVAD	AVTYQLGFHS	IELNEPPLVH	TAASLFKEMC
130	140	15 0	16 0	17 0	180
YRYREDLMAG	IIIAGWDPQE	GGQVYSVPMG	GMMVRQSFAI	GGSGSSYIYG	YVDATYREGM
19 0	20 0	21 0	22 0	23 0	
TKDECLQFTA	NALALAMERD	GSSGGVIRLA	AIQESGVERQ	VLLGDQIPKF	TIATLPPP

β2-UE 20S-Proteasom Maus P70195 (PSB7_MOUSE) 29.9 kDa (plus Propeptid)

10	20	30	40	5 0	6 0
MAAVSVFQPP	VGGFSFDNCR	RNAVLEADFA	KKGFKLPKAR	<u>KTG</u> TTIAGVV	YKDGIVLGAD
70	80	9 0	100	110	120
TRATEGMVVA	DKNCSKIHFI	SPNIYCCGAG	TAADTDMTTQ	LISSNLELHS	LTTGRLPRVV
130	140	15 0	16 0	17 0	180
TANRMLKQML	FRYQGYIGAA	LVLGGVDVTG	PHLYSIYPHG	STDKLPYVTM	GSGSLAAMAV
19 0	20 0	21 0	22 0	23 0	240
FEDKFRPDME	EEEAKKLVSE	AIAAGIFNDL	GSGSNIDLCV	ISKSKLDFLR	PFSVPNKKGT
25 0	26 0	27 0			
RLGRYRCEKG	TTAVLTEKVT	PLEIEVLEET	VQTMDTS		

β3-UE 20S-Proteasom Maus Q9R1P1 (PSB3_MOUSE) 23 kDa

10	2 0	30	40	5 0	6 0
MSIMSYNGGA	VMAMKGKNCV	AIAADRRFGI	QAQMVTTDFQ	KIFPMGDRLY	IGLAGLATDV
70	80	9 0	10 0	110	120
QTVAQRLKFR	LNLYELKEGR	QIKPYTLMSM	VANLLYEKRF	GPYYTEPVIA	GLDPKTFKPF
130	140	15 0	16 0	17 0	180
ICSLDLIGCP	MVTDDFVVSG	TCSEQMYGMC	ESLWEPNMDP	EHLFETISQA	MLNAVDRDAV
19 0	20 0				
SGMGVIVHVI	EKDKITTRTL	KARMD			

β4-UE 20S-Proteasom Maus Q9R1P3 (PSB2_MOUSE) 22.9 kDa

10	2 0	30	40	5 0	6 0
MEYLIGIQGP	DYVLVASDRV	AASNIVQMKD	DHDKMFKMSE	KILLLCVGEA	GDTVQFAEYI
7 0	8 0	9 0	10 0	110	120
QKNVQLYKMR	NGYELSPTAA	ANFTRRNLAD	CLRSRTPYHV	NLLLAGYDEH	EGPALYYMDY
130	140	15 0	16 0	17 0	180
LAALAKAPFA	AHGYGAFLTL	SILDRYYTPT	ISRERAVELL	RKCLEELQKR	FILNLPTFSV
19 0	20 0				
RVIDKDGIHN	LENIAFPKRD	S			

β5-UE 20S-Proteasom Maus O55234 (PSB5_MOUSE) 28.5 kDa (plus Propeptid)

10	20	30	40	5 0	6 0
MALASVLQRP	MPVNQHGFFG	LGGGADLLDL	GPGSPGDGLS	LAAPSWGVPE	EPRIEMLHGT
7 0	80	9 0	100	110	120
TTLAFKFLHG	VIVAADSRAT	AGAYIASQTV	KKVIEINPYL	LGTMAGGAAD	CSFWERLLAR
130	140	15 0	16 0	17 0	180
QCRIYELRNK	ERISVAAASK	LLANMVYQYK	GMGLSMGTMI	CGWDKRGPGL	YYVDSEGNRI
19 0	20 0	21 0	22 0	23 0	24 0
SGTAFSVGSG	SVYAYGVMDR	GYSYDLKVEE	AYDLARRAIY	QATYRDAYSG	GAVNLYHVRE
25 0	26 0				
DGWIRVSSDN	VADLHDKYSS	VSVP			

β6-UE 20S-Proteasom Maus O09061 (PSB1_MOUSE) 26.4 kDa (plus Propeptid)

10	20	30	40	5 0	6 0
MLSTAAYRDV	ERELGMGPHG	SAGPVQLRFS	PYAFNGGTVL	AIAGEDFSIV	ASDTRLSEGF
70	80	9 0	10 0	110	120
SIHTRDSPKC	YKLTDKTVIG	CSGFHGDCLT	LTKIIEARLK	MYKHSNNKAM	TTGAIAAMLS
130	140	15 0	16 0	17 0	180
TILYSRRFFP	YYVYNIIGGL	DEEGKGAVYS	FDPVGSYQRD	SFKAGGSASA	MLQPLLDNQV
19 0	20 0	21 0	22 0	23 0	240
GFKNMQNVEH	VPLTLDRAMR	LVKDVFISAA	ERDVYTGDAL	RICIVTKEGI	REETVPLRKD

β7-UE 20S-Proteasom Maus P99026 (PSB4_MOUSE) 29.1 kDa (plus Propeptid)

10	20	30	40	5 0	6 0
MEAFWESRAG	HWAGGPAPGQ	FYRIPATPSG	LMDPASAPCE	GPITRTQNPM	VTGTSVLGVK
70	80	90	100	110	120
FDGGVVIAAD	MLGSYGSLAR	FRNISRIMRV	NDSTMLGASG	DYADFQYLKQ	VLGQMVIDEE
130	140	15 0	16 0	17 0	18 0
LLGDGHSYSP	RAIHSWLTRA	MYSRRSKMNP	LWNTMVIGGY	ADGESFLGYV	DMLGVAYEAP
19 0	20 0	210	22 0	230	24 0
SLATGYGAYL	AQPLLREVLE	KQPVLSQTEA	RELVERCMRV	LYYRDARSYN	RFQIATVTEK
25 0	26 0				
GVEIEGPLSA	QTNWDIAHMI	SGFE			

β1i-UE 20S-Proteasom Maus P28076 (PSB9_MOUSE) 23.4 kDa (plus Propeptid)

10	20	30	40	5 0	6 0
MLRAGAPTAG	SFRTEEVHTG	TTIMAVEFDG	GVVVGSDSRV	SAGTAVVNRV	FDKLSPLHQR
7 0	8 0	9 0	100	110	120
IFCALSGSAA	DAQAIADMAA	YQLELHGLEL	EEPPLVLAAA	NVVKNISYKY	REDLLAHLIV
13 0	140	15 0	16 0	170	180
AGWDQREGGQ	VYGTMGGMLI	RQPFTIGGSG	SSYIYGYVDA	AYKPGMTPEE	CRRFTTNAIT
19 0	20 0	21 0			
LAMNRDGSSG	GVIYLVTITA	AGVDHRVILG	DELPKFYDE		

β2i-UE 20S-Proteasom Maus O35955 (PSB10_MOUSE) 29 kDa (plus Propeptid)

10	20	30	40	5 0	6 0
MLKQAVEPTG	GFSFENCQRN	ASLEHVLPGL	RVPHARKTGT	TIAGLVFRDG	VILGADTRAT
7 0	8 0	9 0	100	110	120
NDSVVADKSC	EKIHFIAPKI	YCCGAGVAAD	TEMTTRMAAS	KMELHALSTG	REPRVATVTR
13 0	140	15 0	16 0	170	180
ILRQTLFRYQ	GHVGASLVVG	GVDLNGPQLY	EVHPHGSYSR	LPFTALGSGQ	GAAVALLEDR
19 0	20 0	21 0	22 0	23 0	24 0
FQPNMTLEAA	QELLVEAITA	GILSDLGSGG	NVDACVITAG	GAKLQRALST	PTEPVQRAGR
25 0	26 0	27 0			
YRFAPGTTPV	LTREVRPLTL	ELLEETVQAM	EVE		

β5i-UE 20S-Proteasom Maus P28063 (PSB8_MOUSE) 30.2 kDa (plus Propeptid)

10	20	30	40	5 0	6 0
MALLDLCGAA	RGQRPEWAAL	DAGSGGRSDP	GHYSFSAQAP	ELALPRGMQP	TAFLRSFGGD
70	80	9 0	100	110	120
QERNVQIEMA	HGTTTLAFKF	QHGVIVAVDS	RATAGSYISS	LRMNKVIEIN	PYLLGTMSGC
130	140	15 0	16 0	17 0	180
AADCQYWERL	LAKECRLYYL	RNGERISVSA	ASKLLSNMML	QYRGMGLSMG	SMICGWDKKG
19 0	20 0	210	22 0	23 0	240
PGLYYVDDNG	TRLSGQMFST	GSGNTYAYGV	MDSGYRQDLS	PEEAYDLGRR	AIAYATHRDN
25 0	26 0	27 0			
YSGGVVNMYH	MKEDGWVKVE	SSDVSDLLYK	YGEAAL		

Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge

08/2009	Poster: "Mapping of monomeric O-GlcNAc-sites of proteasomes by mass spectrometry." Proteomics Summer school 2009, Brixen, Italien
09/2008	Vortrag: "Mapping of monomeric O-GlcNAc-sites of proteasomes by mass spectrometry." 19th European Students Conference 2008, Berlin, Deutschland
04/2007	Poster: "Modifizierung von 20S Proteasomen mit monomerem O-GlcNAc", DGMS 2007, Bremen, Deutschland
06/2004	Poster: "ACE-inhibitory actions of red wine extracts." NAROSSA 2004, Magdeburg, Deutschland

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn Professor Kloetzel bedanken, dass er es mir ermöglicht hat meine Promotionsarbeit an seinem Institut anzufertigen und für das Vertrauen, dass er in mich gesetzt hat.

Außerdem danke ich Herrn Professor Lauster, der es mir ermöglichte meine Arbeit an der Technischen Universität Berlin einzureichen und der Sonnenfeldstiftung, die mich über zwei Jahre meiner Promotion finanziell über ein Stipendium unterstützte. Hierbei gilt mein besonderer Dank Herrn Professor von Villiez, welcher immer an den Fortschritten meiner Arbeit interessiert war.

Ich danke außerdem meinen beiden Betreuerinnen Frau Dr. Katharina Janek, die mich in die Geheimnisse der Massenspektrometrie eingeführt hat und Frau Doktor Ulrike Kuckelkorn, welche den biochemischen Teil meiner Arbeit betreute und immer ein offenes Ohr und den einen oder anderen Schulterklopfer für mich hatte. Frau Doktor Petra Henklein danke ich für die Zeit, die sie als meine Drittbetreuerin eingesprungen ist und für mich den Biotin-Cystamin-Tag synthetisierte, ohne den die präsentierten Ergebnisse nicht hätten produziert werden können.

Ich danke außerdem Herrn Professor Burkhardt Dahlmann und seiner Arbeitsgruppe, die mich quasi teilweise adoptiert haben und ohne die meine Promotionszeit nicht so schön gewesen wäre, wie sie es letztendlich war. Alexander Kloss danke ich für die großartige Idee zu versuchen das Biotin-Cystamin über Gelfiltration aus den Proben zu entfernen. Ihm, Carolin Baumann, Sabrina Gohlke und Dagmar Siele danke ich für das tolle Klima und die Freundschaft, die wir über die Jahre hatten. Ich danke natürlich auch der restlichen "Massetruppe". Kathrin Textoris-Taube, Christin Keller, Agathe Niewienda, Alexander Rabe und Monika Schmid, die mir alle besonders ans Herz gewachsen sind.

Außerdem möchte ich noch besonders Ilse Drung, Dr. Cordula Enenkel, Dottore Michele Mishto, Dr. Peter Henklein, Frizi Schröter, Stefanie Runde, Annett Koch, Isabel Schwieger, Janos Steffen und und und danken für die schöne Zeit und die Unterstützung, außerdem Jana Schlenk, die den Großteil der Korrekturlesungen vorgenommen hat.

Meiner Familie, Ralf und Erika Overtah und meinem Bruder Dirk Overath, danke ich für die große emotionale Unterstützung und ihr Vertrauen darauf, dass ich alles schaffen werde, was ich anpacke! Danke ihr drei!!!

Erklärung

Ich erkläre an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation in allen Teilen von mir selbständig angefertigt wurde und die benutzen Hilfsmittel vollständig angegeben worden sind. Die geltende Promotionsordnung der Technischen Universität Berlin ist mir bekannt.

Kiel, März 2011